



Universitat Ramon Llull

TESI DOCTORAL

Títol: Biosíntesi de glicolípid de membrana en *Mycoplasma genitalium*: expressió, purificació i caracterització d'una glicosiltransferasa processiva en la formació de glicosildiacylglicerols.

Realitzada per Núria Martínez Mas

en el Centre Institut Químic de Sarrià

i en el Departament de Bioenginyeria

Dirigida per el Dr. Antoni Planas Sauter

Als meus pares i al meu germà

"I, a vegades, contra tot pronòstic una gran bestiesa capgira allò
que creiem lògic,
Tot fent evident,
que per un moment,
ens en sortim"

(Captatio benevolentiae, Manel)

ÍNDEX

Sumari	- 13 -
1 Introducció general. Micoplasmes, glicolípid i glicosiltransferases	- 31 -
1.1 Micoplasmes: els organismes autoreplicatius més petits	- 31 -
1.1.1 Característiques principals de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 35 -
1.1.2 La membrana plasmàtica dels micoplasmes	- 36 -
1.1.2.1 El paper dels glicolípid en la regulació de les propietats de la membrana plasmàtica	- 37 -
1.2 Funcions dels glicolípid en altres organismes	- 38 -
1.2.1 Organismes fotosintètics oxigènics: plantes i cianobacteris	- 38 -
1.2.2 Organismes fotosintètics anoxigènics	- 39 -
1.2.3 Bacteris no fotosintètics	- 40 -
1.3 Glicosiltransferases de <i>Mycoplasma genitalium</i> : possibles dianes terapèutiques	- 42 -
1.4 Aplicació industrial dels glicolípid	- 44 -
1.5 Glicosiltransferases: classificació i mecanisme d'acció	- 46 -
1.5.1 Reacció de transglicosilació	- 46 -
1.5.2 Mecanismes de catàlisi	- 47 -
1.5.3 Classificació	- 50 -
1.5.3.1 GT-MG517, membre de la família GT2	- 52 -
1.6 Motivació del treball	- 53 -
1.6.1 Objectius de la tesi	- 54 -
2 Estudi de l'essencialitat de les possibles glicosiltransferases de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 65 -
2.1 Introducció	- 65 -
2.1.1 Gens essencials dins del genoma de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 66 -
2.1.2 Obtenció de <i>knock-outs</i> de <i>Mycoplasma genitalium</i> mitjançant recombinació homòloga	- 68 -
2.1.3 Gens <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i> : possibles glicosiltransferases de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 69 -
2.2 Disseny i construcció dels plasmidis suïcides que permetin generar els <i>knock-outs</i> dels gens <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i> de <i>M. genitalium</i>	- 69 -
2.2.1 Estudi de l'entorn dels gens <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i>	- 70 -
2.2.1.1 Gen <i>mg025</i>	- 70 -
2.2.1.2 Gen <i>mg060</i>	- 71 -
2.2.1.3 Gen <i>mg517</i>	- 72 -
2.2.2 Obtenció dels braços de recombinació pels gens <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i>	- 73 -
2.2.2.1 Disseny dels encebadors per a la reacció de PCR	- 73 -
2.2.2.2 Amplificació dels braços de recombinació a partir d'ADN genòmic de <i>Myc. genitalium</i>	- 75 -
2.2.2.3 Digestió dels braços de recombinació	- 76 -
2.2.3 Obtenció dels plasmidis pΔ <i>mg025</i> , pΔ <i>mg060</i> i pΔ <i>mg517</i>	- 77 -
2.2.3.1 Digestió del vector pUC18	- 77 -
2.2.3.2 Digestió del gen <i>tetM438</i>	- 78 -
2.2.3.3 Lligació dels fragments i anàlisi de transformants	- 78 -
2.3 Obtenció dels <i>knock-outs</i> dels gens <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i> de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 81 -

2.3.1	Transformació de cèl·lules competents de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 81 -
2.3.2	Anàlisi de les colònies transformants per Southern blott.....	- 81 -
2.3.2.1	Knock-out per al gen <i>mg025</i>	- 83 -
2.3.2.2	Knock-out per al gen <i>mg060</i>	- 83 -
2.3.2.3	Knock-out per al gen <i>mg517</i>	- 84 -
2.3.2.4	Identificació dels fenòmens de recombinació per Southern blott.....	- 85 -
2.4	Conclusions.....	- 87 -
3	Estudi de la transcripció de les possibles glicosiltransferases de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 93 -
3.1	Introducció.....	- 93 -
3.1.1	Mecanismes de regulació de la transcripció en <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 93 -
3.2	Reacció de RT-PCR: metodologia i disseny d'encebadors.....	- 94 -
3.2.1	Disseny dels encebadors per a la reacció de RT-PCR sobre <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i>	- 95 -
3.3	Determinació de la transcripció de <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i> en dues fases del creixement de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 96 -
3.3.1	Creixement del bacteri i aïllament de l'ARN.....	- 97 -
3.3.2	Reacció de RT-PCR.....	- 98 -
3.4	Conclusions.....	- 100 -
4	Expressió i purificació de GT-MG517.....	- 107 -
4.1	Introducció.....	- 107 -
4.1.1	Antecedents: mètode previ d'expressió i purificació de GT-MG517.....	- 107 -
4.2	Coexpressió de GT-MG517 amb xaperones.....	- 109 -
4.2.1	Comparativa de l'expressió de GT-MG517 amb i sense l'ús de xaperones.....	- 111 -
4.3	Detergents per a la solubilització de proteïnes associades a membrana.....	- 112 -
4.3.1	Selecció d'un detergent adequat per a l'extracció de GT-MG517.....	- 116 -
4.4	Purificació de GT-MG517 mitjançant la seva solubilització amb Triton x-100.....	- 119 -
4.4.1	Selecció del millor tampó de solubilització amb base Triton x-100.....	- 119 -
4.4.2	Purificació de GT-MG517 solubilitzada amb Triton x-100 mitjançant cromatografia d'afinitat.....	- 120 -
4.4.2.1	Identificació per MALDI de les impureses que coelueixen amb GT-MG517.....	- 122 -
4.4.3	Aplicació de la cromatografia de gel-filtració a la purificació de GT-MG517.....	- 123 -
4.4.3.1	Cromatografia de gel-filtració amb tampons amb base Triton x-100.....	- 124 -
4.4.3.2	Cromatografia de gel-filtració amb detergents del tipus alquil glicòsid.....	- 125 -
4.4.3.3	Cromatografia de gel-filtració de GT-MG517 sense detergents.....	- 127 -
4.5	Purificació de GT-MG517 mitjançant la seva solubilització amb CHAPS.....	- 129 -
4.5.1	Selecció del millor tampó de solubilització amb base CHAPS.....	- 129 -
4.5.2	Purificació de GT-MG517 solubilitzada amb CHAPS mitjançant cromatografia d'afinitat.....	- 131 -
4.5.2.1	Cromatografia d'afinitat en presència de CHAPS.....	- 131 -
4.5.2.2	Cromatografia d'afinitat en absència de CHAPS.....	- 133 -
4.5.2.3	Selecció del millor protocol de purificació de GT-MG517 per cromatografia d'afinitat.....	- 135 -
4.5.3	Aplicació de la cromatografia d'hidroxiapatita a la purificació de GT-MG517.....	- 136 -

4.5.4	Aplicació de la cromatografia de gel-filtració a la purificació de GT-MG517	138 -
4.5.4.1	Identificació per MALDI de les impureses que coelueixen amb GT-MG517	141 -
4.6	Selecció del procediment més adequat de purificació de GT-MG517	143 -
5	Estudi cinètic de l'activitat enzimàtica de GT-MG517	151 -
5.1	Introducció	151 -
5.2	Estudis previs: anàlisi qualitativa de l'activitat enzimàtica de GT-MG517	155 -
5.2.1	Regulació de l'activitat enzimàtica de GT-MG517 per part de la membrana	156 -
5.2.2	Especificitat de l'enzim per substrat donador i substrat acceptor	158 -
5.2.3	Requeriment de cofactor metàl·lic per l'activitat enzimàtica de GT-MG517	159 -
5.3	Anàlisi quantitativa: disseny i desenvolupament d'un assaig radiomètric	160 -
5.3.1	Obtenció de les rectes patró dels substrats donadors i establiment del temps de comptatge òptim	162 -
5.3.2	Optimització del procés d'extracció dels glicolípid sintetitzats	164 -
5.3.3	Preparació d'una reacció estàndard i obtenció de velocitats inicials	165 -
5.3.3.1	Preparació de miscel·les mixtes detergent/acceptor/enzim.	166 -
5.3.3.2	Obtenció d'una corba de progrés de reacció	167 -
5.3.4	Repetibilitat de l'assaig radiomètric	167 -
5.3.5	Determinació dels glicolípid formats en l'assaig radiomètric per HPLC-MS	168 -
5.4	Caracterització cinètica de GT-MG517 en extracte proteic.....	171 -
5.4.1	Obtenció de l'extracte proteic	171 -
5.4.2	Activitat específica de GT-MG517 en extracte	171 -
5.4.3	Paràmetres cinètics aparents del substrat donador per GT-MG517 en extracte.....	173 -
5.5	Caracterització cinètica de GT-MG517 purificada.....	174 -
5.5.1	Obtenció de GT-MG517 purificada.....	174 -
5.5.2	Rectes patró enzimàtiques	175 -
5.5.3	Paràmetres cinètics de GT-MG517 com a monoglicosildiacilglicerol sintasa.....	176 -
5.5.3.1	Paràmetres cinètics aparents del substrat donador	176 -
5.5.3.2	Paràmetres cinètics aparents del substrat acceptor	177 -
5.5.3.3	Influència dels lípid aniónics sobre l'activitat de GT-MG517	178 -
5.5.4	Paràmetres cinètics de GT-MG517 com a diglicosildiacilglicerol sintasa	182 -
5.5.4.1	Paràmetres cinètics aparents del substrat donador	183 -
5.5.4.2	Paràmetres cinètics aparents del substrat acceptor	185 -
5.5.5	Comparativa respecte les glicosiltransferases d' <i>Acholeplasma laidlawii</i>	186 -
5.5.6	Comparativa respecte la glicosiltransferasa de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> MPN483	188 -
5.6	Conclusions	189 -
6	Anàlisi funcional de l'extrem C-terminal de GT-MG517	195 -
6.1	Introducció.....	195 -
6.1.1	Anàlisi bioinformàtica de la seqüència de GT-MG517.....	196 -
6.2	Obtenció de formes truncades de GT-MG517 a nivell d'ADN.....	201 -

6.2.1	Construcció del vector pET517HisN	- 201 -
6.2.2	Expressió i purificació de GT-MG517 a partir del vector pET517HisN	- 202 -
6.2.3	Producció de glicolípid per part de GT-MG517HisN	- 204 -
6.2.4	Estratègia de subclonació per a l'obtenció de les formes truncades de GT-MG517	- 205 -
6.2.4.1	Disseny dels encebadors	- 206 -
6.2.4.2	Obtenció de les formes truncades de <i>mg517</i> per PCR.....	- 207 -
6.2.4.3	Construcció dels vectors finals d'expressió.....	- 207 -
6.3	Expressió i purificació de les set formes truncades de GT-MG517	- 209 -
6.3.1	Anàlisi per MALDI-TOF del pes molecular de les formes truncades de GT-MG517	- 211 -
6.4	Anàlisi de l'activitat in vivo de les formes truncades de GT-MG517	- 214 -
6.5	FT7-MG517(1-197): hipotètic domini catalític de GT-MG517	- 215 -
6.6	Conclusions	- 219 -
7	Conclusions	- 225 -
8	Protocols de biologia molecular	- 235 -
8.1	Capítol 2: Estudi de l'essencialitat de les possibles glicosiltransferases de <i>Mycoplasma genitalium</i> ...	- 235 -
8.1.1	Preparació de medi SP4	- 235 -
8.1.2	Obtenció d'ADN genòmic de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 235 -
8.1.3	Amplificació per PCR dels braços de recombinació necessaris per a l'obtenció de <i>knock-outs</i> dels gens <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i>	- 236 -
8.1.4	Digestió dels fragments necessaris per a la construcció de pΔ <i>mg025</i> , pΔ <i>mg060</i> i pΔ <i>mg517</i>	- 237 -
8.1.4.1	Digestió dels braços de recombinació dels gens <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i>	- 237 -
8.1.4.2	Digestió del vector pUC18.....	- 238 -
8.1.4.3	Digestió del gen <i>tetM438</i>	- 239 -
8.1.5	Lligació dels fragments necessaris per a l'obtenció de pΔ <i>mg025</i> , pΔ <i>mg060</i> i pΔ <i>mg517</i>	- 239 -
8.1.6	Anàlisi de transformants per a les construccions pΔ <i>mg025</i> , pΔ <i>mg060</i> i pΔ <i>mg517</i>	- 240 -
8.1.6.1	Anàlisi de restricció dels clons obtinguts.....	- 241 -
8.1.6.2	Anàlisi per PCR dels clons obtinguts	- 241 -
8.1.7	Obtenció dels <i>knock-outs</i> dels gens <i>mg025</i> , <i>mg060</i> i <i>mg517</i> de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 242 -
8.1.7.1	Obtenció d'un stock de les construccions pΔ <i>mg025</i> , pΔ <i>mg060</i> i pΔ <i>mg517</i>	- 242 -
8.1.7.2	Transformació de cèl·lules competents de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 243 -
8.1.8	Anàlisi de les colònies transformants per Southern blott	- 244 -
8.1.8.1	Transferència a una membrana de niló per capil·laritat en condicions alcalines	- 244 -
8.1.8.2	Hibridació de la membrana amb una sonda marcada amb digoxigenina-11-dUTP	- 244 -
8.1.8.2.1	Síntesi de la sonda.....	- 245 -
8.1.8.2.2	Hibridació de la sonda amb la membrana.....	- 245 -
8.1.8.3	Detecció immunològica de la sonda marcada amb digoxigenina-11-dUTP	- 245 -
8.2	Capítol 3: Estudi de la transcripció de les possibles glicosiltransferases de <i>Mycoplasma genitalium</i> ..	- 246 -
8.2.1	Aïllament d'ARN de <i>Mycoplasma genitalium</i>	- 246 -
8.2.2	Reacció de RT-PCR	- 247 -

8.3	Capítol 6: Anàlisi funcional de l'extrem C-terminal de GT-MG517	- 248 -
8.3.1	Construcció del vector pET517HisN	- 248 -
8.3.2	Obtenció de les formes truncades de <i>mg517</i> per PCR	- 250 -
8.3.3	Construcció dels vectors finals d'expressió per a les formes truncades	- 251 -
8.3.3.1	Digestió del vector pET-15b(+)	- 251 -
8.3.3.2	Lligació de les formes truncades amb el fragment del vector pET-15b(+)	- 252 -
8.3.3.3	Anàlisi de transformants per PCR	- 253 -
9	Protocols d'expressió i purificació de proteïnes	- 259 -
9.1	Expressió i extracció de GT-MG517	- 259 -
9.1.1	Expressió i extracció de GT-MG517 a partir de la construcció pET517HisC mitjançant xoc tèrmic	- 259 -
9.1.2	Expressió i extracció de GT-MG517 a partir de la construcció pET517HisC mitjançant co-expressió amb xaperones en un volum de cultiu de 50 mL o menor	- 259 -
9.1.3	Expressió i extracció de GT-MG517 a partir de la construcció pET517HisC mitjançant co-expressió amb xaperones en un volum de cultiu d'1 L	- 260 -
9.1.4	Expressió i extracció de GT-MG517 a partir de la construcció pET517HisN mitjançant co-expressió amb xaperones en un volum de cultiu d'1 L	- 261 -
9.1.5	Expressió i extracció de FT-MG517(1-197) en un volum de cultiu d'1 L	- 261 -
9.2	Purificació de GT-MG517 mitjançant cromatografia d'afinitat per metall (IMAC)	- 262 -
9.3	Purificació de GT-MG517 mitjançant cromatografia de gel-filtració	- 264 -
9.4	Purificació de GT-MG517 mitjançant una columna d'hidroxiapatita	- 264 -
9.5	Canvi de tampó mitjançant immobilització en una resina d'afinitat per Ni ²⁺	- 265 -
9.6	Mètodes colorimètrics de quantificació de proteïnes	- 266 -
9.6.1	Mètode de Lowry per a la quantificació de solucions proteiques	- 266 -
9.6.2	Mètode de BCA per a la quantificació de solucions proteiques	- 267 -
10	Protocols per a la determinació de l'activitat glicosiltransferasa i la producció de glicolípids	- 273 -
10.1	Anàlisi de la producció de glicolípids in vivo	- 273 -
10.2	Anàlisi de la producció de glicolípids ex vivo: assaig qualitatiu	- 273 -
10.2.1	Preparació d'extractes cel·lulars de cèl·lules d' <i>E.coli</i> per a l'assaig d'activitat qualitatiu	- 273 -
10.2.2	Assaig d'activitat qualitatiu	- 274 -
10.3	Assaig d'activitat radiomètric	- 275 -
10.3.1	Obtenció de les rectes patró dels substrats donadors i optimització del temps de comptatge	- 275 -
10.3.2	Optimització del procés d'extracció dels glicolípids de nova síntesi	- 276 -
10.3.3	Preparació d'una reacció estàndard	- 276 -
10.3.4	Obtenció d'una corba de progrés de la reacció	- 277 -
10.4	Producció i purificació de MGlcDG per al seu ús com a substrat acceptor en l'estudi cinètic de GT-MG517 com a DGlcDG sintasa	- 277 -
10.4.1	Obtenció de l'extracte proteic de GT-MG517	- 277 -
10.4.2	Producció de glicolípids ex vivo	- 278 -

10.4.3	Separació del MGlcDG mitjançant una columna de sílice	- 279 -
10.5	Determinació dels productes sintetitzats per GT-MG517 mitjançant HPLC-MS	- 279 -
11	Bibliografia	- 287 -
12	Annex 1: Dades cinètiques de l'activitat enzimàtica de GT-MG517	- 307 -
12.1	Obtenció de les rectes patró dels substrats donadors	- 307 -
12.2	Determinació dels glicolípids formats en l'assaig radiomètric per HPLC-MS	- 309 -
12.3	Caracterització de GT-MG517 en extracte proteic	- 309 -
12.3.1	Activitat específica de GT-MG517 en extracte	- 309 -
12.3.2	Paràmetres cinètics aparents del substrat donador per GT-MG517 en extracte	- 309 -
12.4	Caracterització cinètica de GT-MG517 purificada	- 310 -
12.4.1	Rectes patró enzimàtiques	- 310 -
12.4.2	Paràmetres cinètics de GT-MG517 com a monoglicosildiacilglicerol sintasa	- 310 -
12.4.2.1	Paràmetres cinètics aparents del substrat donador	- 310 -
12.4.2.2	Paràmetres cinètics aparents del substrat acceptor	- 311 -
12.4.2.3	Influència dels lípids aniònics sobre l'activitat de GT-MG517	- 311 -
12.4.3	Paràmetres cinètics de GT-MG517 com a diglicosildiacilglicerol sintasa	- 312 -
12.4.3.1	Paràmetres cinètics aparents del substrat donador	- 312 -
12.4.3.2	Paràmetres cinètics aparents del substrat acceptor	- 312 -
13	Annex 2: Alineaments de seqüències	- 317 -
13.1	Seqüència de pET517HisN	- 317 -
13.2	Seqüenciació de pET517HisN(T1-337)	- 323 -
13.3	Seqüenciació de pET517HisN(T1-331)	- 326 -
13.4	Seqüenciació de pET517HisN(T1-328)	- 329 -
13.5	Seqüenciació de pET517HisN(T1-315)	- 332 -
13.6	Seqüenciació de pET517HisN(T1-304)	- 335 -
13.7	Seqüenciació de pET517HisN(T1-297)	- 338 -
13.8	Seqüenciació de pET517HisN(T1-197)	- 341 -

SUMARI

Aquesta tesi se centra en l'estudi de les possibles glicosiltransferases de *Mycoplasma genitalium* involucrades en la síntesi de glicolípids. Aquests compostos formen part de la membrana plasmàtica del microorganisme, únic envoltall que el protegeix del seu entorn ja que no disposa de paret cel·lular. La hipòtesi sobre la qual s'ha desenvolupat el treball és la possibilitat que aquests glicolípids i els enzims encarregats de la seva producció, les glicosiltransferases, siguin essencials per a la viabilitat del micoplasma i per tant, la seva inhibició sigui una forma d'eradicar les infeccions causades pel patògen.

De les tres seqüències classificades com a glicosiltransferases en el genoma de *Mycoplasma genitalium*, *mg025*, *mg060* i *mg517*, s'ha determinat que *mg025* és l'únic dels tres gens que no és essencial per al bacteri, tot i que s'ha observat que els tres s'expressen tant a la fase exponencial com a la fase estacionària del seu creixement. La funció de *mg025* i *mg060* és encara desconeguda, mentre que *mg517* és la glicosiltransferasa encarregada de la síntesi dels dos principals glicolípids del micoplasma, el monoglicosildiacylglicerol (MGlcDG) i el diglicosildiacylglicerol (DGlcDG).

En aquesta tesi s'ha desenvolupat un protocol d'expressió per a la glicosiltransferasa codificada per *mg517*, anomenada GT-MG517, el qual fa ús d'una coexpressió amb xaperones i solubilitza la proteïna amb detergents, glicerol i una elevada força iònica. Aquesta metodologia ha estat necessària ja que GT-MG517 és una proteïna associada a membrana i la seva expressió recombinant en *E.coli* presenta dificultats. La proteïna s'ha purificat mitjançant cromatografia d'afinitat per Ni, tot i que el grau de puresa assolit no ha estat suficient per a intentar la seva cristallització. Les diverses proves realitzades usant cromatografia d'exclusió molecular han permès determinar que GT-MG517 forma oligòmers d'alt pes molecular.

A partir de la proteïna purificada s'ha realitzat un estudi cinètic de la seva doble activitat glicosildiacylglicerolsintasa. D'aquest estudi s'extreu que GT-MG517 pot transferir un sucre, Glc o Gal, a una molècula principalment hidrofòbica, com és el DOG, i a una molècula molt més hidrofílica, com el MGlcDG. Ambdós compostos però posseeixen un alcohol primari sobre el qual té lloc la transferència creant l'enllaç $\beta(1\rightarrow6)$. Amb qualsevol dels substrats acceptors provats, l'enzim presenta activitats específiques superiors si el substrat donador és UDP-Gal. L'acceptor preferit de GT-MG517 és el lípid DOG, però la glicosiltransferasa és capaç d'elongar, ja sigui amb una Glc o amb una Gal, glicolípids com el MGlcDG i el MGDEG, preferint en aquest cas el compost amb una Gal a l'extrem no reductor. Tot i això, l'afinitat de l'enzim és superior per a donadors amb Glc (K_M inferiors a les dels donadors amb Gal). D'altra banda, s'ha demostrat que el lípid aniònic DOPG es comporta com a activador de l'activitat enzimàtica.

GT-MG517 posseeix un teòric domini d'unió d'UDP-Glc a l'extrem N-terminal. Aquesta zona presenta similitud de seqüència amb altres glicosiltransferases i permet la classificació de GT-MG517 dins de la família GT-2. En canvi, el seu extrem C-terminal presenta una seqüència particular que no s'alinea amb altres proteïnes. En aquesta tesi es formula la hipòtesi que aquesta zona podria ser d'interacció amb la membrana i, a més, que aquesta interacció podria regular l'activitat enzimàtica. Per això es preparen diverses formes truncades de GT-MG517, en les quals s'eliminen alguns aminoàcids de l'extrem C-terminal, i una forma en la qual només es conserva l'hipotètic domini d'unió d'UDP-Glc. Aquestes noves proteïnes s'expressen, solubilitzen i purifiquen aplicant el protocol establert per a la forma completa. Amb l'anàlisi dels glicolípids sintetitzats s'estableix que els deu últims aminoàcids de GT-MG517 són prescindibles per a la seva activitat, ja que les formes truncades corresponents continuen tenint la capacitat de sintetitzar glicolípids. No obstant, l'eliminació d'un nombre superior de residus, inactiva la proteïna. La purificació de l'hipotètic domini d'unió d'UDP-Glc posa de manifest que forma oligòmers, de la mateixa forma que ho fa la proteïna completa.

INTRODUCCIÓ

Capítol 1: Introducció general.
Mícoplasmes, glícolípíds
i glícosíltransferases

1 Introducció general. Micoplasmes, glicolípid i glicosiltransferases

1.1 Micoplasmes: els organismes autoreplicatius més petits

Els micoplasmes són organismes procariotes que es diferencien de la resta de bacteris per l'absència en la seva estructura d'una paret cel·lular. Aquesta diferència permet classificar-los en una classe apart anomenada *Mollicutes*, dins la qual es distingeixen diversos ordres, famílies i gèneres, tal com es mostra a la Taula 1.1.

Taula 1.1 Classificació taxonòmica de la classe Mollicutes.

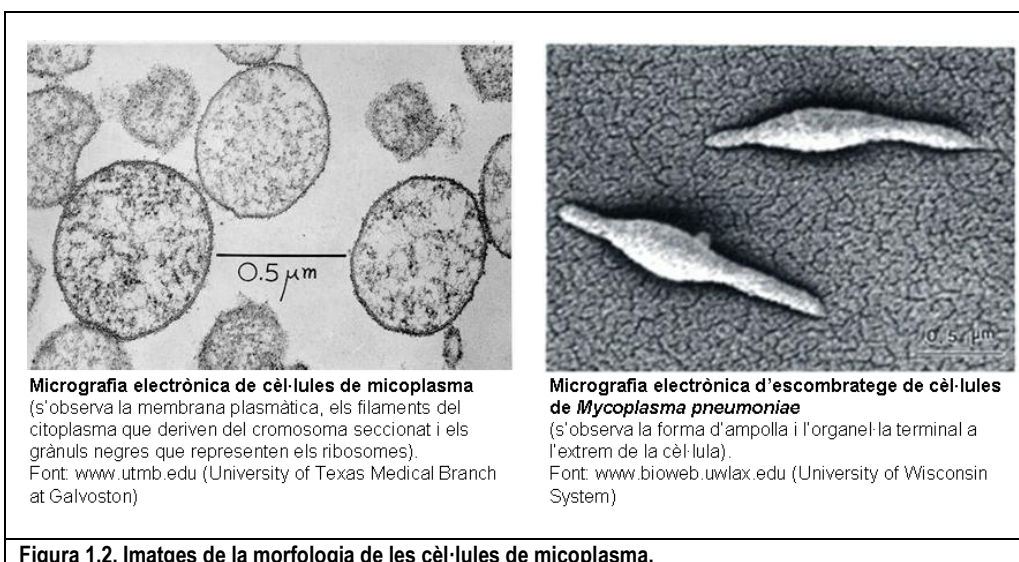
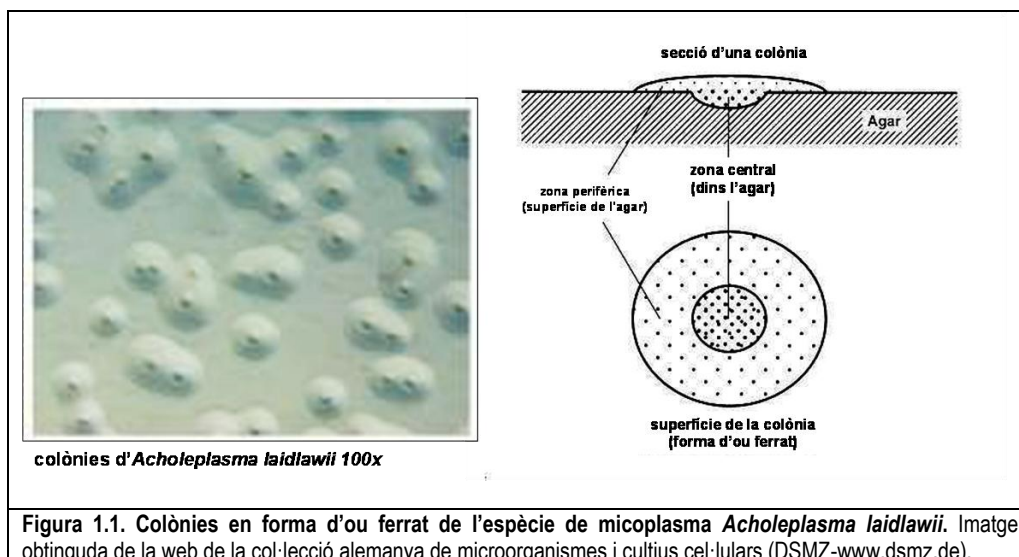
Taula 11. Classificació taxonòmica de la classe Mollicutes.			
Classe	Ordre	Família	Gènere
Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	Acholeplasma
			Candidatus Phytoplasma
	Anaeroplasmatales	Anaeroplasmataceae	Anareoplasma
			Asteroleplasma
	Entomoplasmatales	Entomoplasmataeae	Entomoplasma
			Mesoplasma
			Spiroplasmataceae
	Haloplasmatales	Haloplasmataceae	Haloplasma
	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Candidatus Hepatoplasma
			Mycoplasma
			Ureaplasma
Mollicutes encara no classificats			

Font: NCBI (National Center for Biotechnology Information) taxonomy database

Actualment existeixen gairebé 200 espècies de *Mollicutes* descrites, tot i que el seu nombre va en augment [Razin, S. i Hayflick, L., 2010]. Existeix un ampli consens a l'hora de determinar que els micoplasmes van desenvolupar-se ara fa uns 600 milions d'anys a partir de bacteris gram-positiu mitjançant un procés d'evolució reductiva el qual va comportar la pèrdua de la paret bacteriana i la reducció del genoma, permetent la seva descripció com els organismes més petits i més simples amb capacitat autoreplicativa coneguts en l'actualitat.

La manca de paret cel·lular provoca que els micoplasmes siguin molt sensibles a xocs osmòtics, ja que l'única barrera que posseeixen per protegir-se i a la vegada interaccionar amb el seu entorn és la membrana plasmàtica. D'altra banda, i pel mateix motiu, presenten resistència a antibiòtics dissenyats específicament contra mecanismes de construcció de la paret bacteriana, com per exemple, la penicil·lina. També a causa de la manca de paret cel·lular, els micoplasmes formen colònies amb forma d'ou ferrat quan són cultivats sobre medi sòlid (Figura 1.1).

Les cèl·lules dels micoplasmes són morfològicament molt simples i es troben constituïdes per la membrana plasmàtica, els ribosomes i una molècula d'ADN circular. Moltes espècies presenten una forma esfèrica amb mides que oscil·len entre els 0.3 i 0.8 µm de diàmetre, però d'altres presenten formes diverses, entre les que destaca la forma d'ampolla, amb una estructura semblant a una punta situada en un extrem de la cèl·lula que rep el nom d'organel·la terminal (Figura 1.2). Aquesta morfologia se sustenta en un citoesquelet que, a més, participa en la divisió cel·lular i per aquells micoplasmes que en presenten, en la motilitat.



Els micoplasmes posseeixen un cromosoma molt petit, d'entre 580 kb i 2200 kb en funció de l'espècie, comparat amb el d'altres bacteris com per exemple *Escherichia coli*, el genoma del qual té 4640 kb. A part de la seva reduïda mida, una de les seves principals característiques és el baix contingut en G+C, el qual es troba entre el 24 % i el 33 % de mitjana en funció de l'espècie [Razin, S. *et al*, 1998]. Cal dir, però, que la distribució de G+C en el genoma és irregular, com ho demostra el fet que les zones no codificants poden arribar a posseir un percentatge de G+C d'únicament un 10 % o un 20 %. El resultat d'aquesta pressió evolutiva, anomenada pressió A-T, ha forçat un ús de codó diferencial respecte altres bacteris. Així, els micoplasmes utilitzen preferentment per a codificar un determinat aminoàcid el codó més ric en A i T de tots els sinònims existents en el codi universal. Com a conseqüència d'aquest fet, algunes espècies de micoplasmes empenen el codó TGA per codificar l'aminoàcid triptòfan, en comptes d'usar-lo com a codó de parada, fet que dificulta l'expressió recombinant de proteïnes de micoplasma en altres organismes.

La reducció del material genètic ha propiciat la pèrdua per part dels micoplasmes de moltes de les activitats metabòliques presents en els altres organismes procariotes, fent necessària la vida com a paràsits en el si d'un hoste. Entre aquests es troben els humans, altres mamífers, rèptils, peixos, artròpodes i plantes. Tot i aquesta

àmplia varietat d'organismes, els micoplasmes posseeixen una especificitat força elevada per a un determinat hoste i teixit, molt possiblement degut a les necessitats nutricionals i ambientals derivades de la vida parasitària.

L'absència d'un cicle de Krebs complet o de citocroms o quinones força que l'ATP no s'obtingui per fosforilació oxidativa, sinó mitjançant un mecanisme molt menys eficient com és la fosforilació a nivell de substrat. Segons la seva capacitat per metabolitzar carbohidrats, els micoplasmes es classifiquen en fermentatius i no fermentatius. Els primers poden realitzar la glucòlisi i posseeixen una part de la ruta de les pentoses-fosfat, mentre que els segons han desenvolupat una ruta metabòlica que els permet l'obtenció d'ATP a partir de la degradació d'arginina (ruta de l'arginina dihidrolasa). La delimitació entre aquests dos grups, però, no és del tot clara, ja que algunes espècies de micoplasmes tenen els enzims necessaris per dur a terme ambdues rutes metabòliques [Miles, R. J., 1992]. També cal esmentar l'obtenció d'ATP a partir de la urea, requeriment únic entre els éssers vius i present en els ureaplasmes [Neyrolles, O., *et al*, 1996].

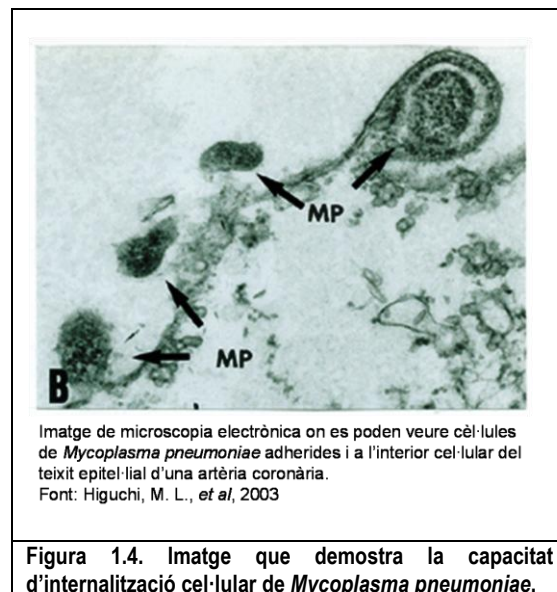
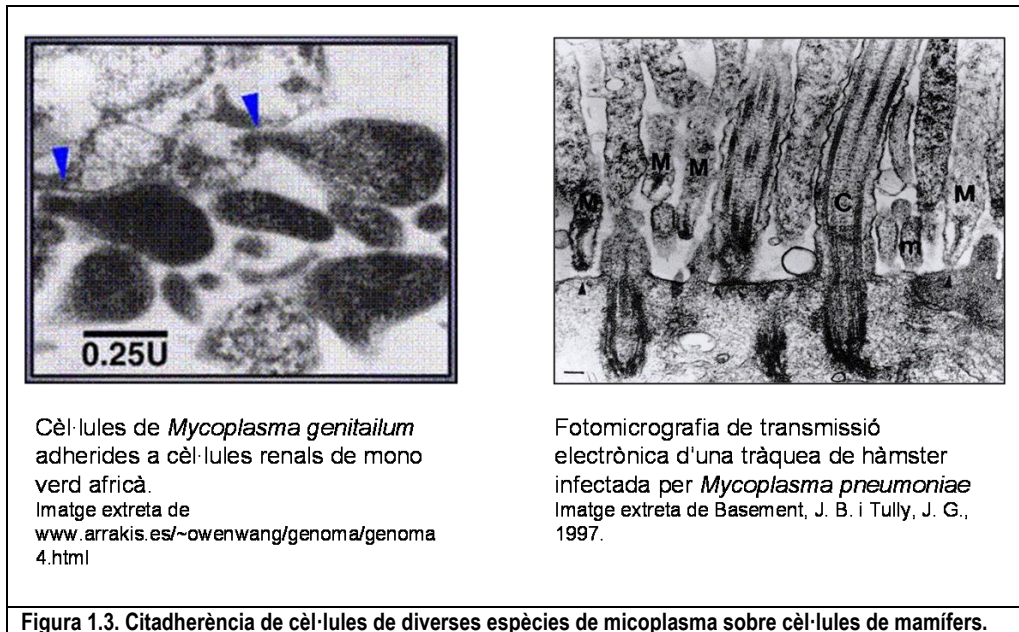
Tot i el desavantatge que suposa per als micoplasmes l'incapacitat d'obtenir ATP mitjançant una fosforilació oxidativa, aquest és força relatiu, ja que la seva despesa energètica en processos de biosíntesi és baixa i per tant, els seus requeriments d'ATP no són molt importants. Es coneix que els micoplasmes han d'adquirir del seu hoste o del medi de cultiu tots els aminoàcids necessaris per a la síntesi proteica, la majoria de cofactors, colesterol, àcids grassos i les bases púriques i pirimidíniques precursors dels àcids nucleics [Razin, S. *et al*, 1998]. La presència d'únicament una membrana plasmàtica com a barrera per al pas de totes aquestes substàncies és la responsable d'uns sistemes de transport molt simplificats, a la vegada que l'economització de gens propicia que siguin poc específics [Saurin, W. i Dassa, E., 1996]. Aquesta economització no ha afectat, però, als gens relacionats amb la replicació d'ADN, transcripció i traducció per a la síntesi de proteïnes, ja que els micoplasmes no poden importar-les del seu hoste i requereixen, doncs, de tota la maquinària necessària per a obtenir-les.

Per a la majoria d'hostes, els micoplasmes són organismes patògens, si bé en el cas dels artròpodes la seva relació amb aquests bacteris pot descriure's com a simbiòtica. Ara bé, les causes de la patogenicitat dels micoplasmes són, encara avui, poc clares. Les infeccions causades per aquests microorganismes són habitualment lleus. Aquesta característica suggereix que deriven d'una resposta del sistema immunitari i inflamatori de l'hoste, més que d'un efecte tòxic directe d'algun dels seus components cel·lulars, tot i que alguns treballs defensen que el dany cel·lular causat pels micoplasmes és degut a processos oxidatius alimentats per peròxid d'hidrogen i altres radicals superòxid generats pel bacteri [Razin, S. i Hayflick, L., 2010].

La majoria dels micoplasmes humans i animals tenen com a hàbitat les mucoses dels sistema respiratori o del tracte urogenital, on s'adhereixen a les cèl·lules del teixit epitelial (Figura 1.3). La citadherència es considera un requisit essencial per a la virulència dels micoplasmes i per a la seva capacitat d'infecció, ja que mutants defectius en aquest tret només recuperen la seva potència infectiva quan recuperen el fenotip d'adhesió cel·lular [Razin, S. i Jacobs, E., 1992].

D'altra banda, les infeccions causades per micoplasmes es descriuen sovint com a cròniques, fet que implica el fracàs dels mecanismes de defensa de l'hoste en l'eradicació d'aquests paràsits. Sembla doncs que, tot i la seva suposada simplicitat, els micoplasmes posseeixen sofisticats mecanismes que els permeten adaptar-se ràpidament

a entorns canviants. Aquesta capacitat es coneix amb el nom de variació antigènica i consisteix en la possibilitat de modificar de forma reversible l'expressió dels principals antigens proteics de superfície de la membrana, de manera que el micoplasma pot escapar i mantenir-se invisible al sistema immunitari de l'hoste.



Un altre dels mecanismes de què disposen els micoplasmes per a sobreviure a l'interior d'un hoste és la internalització dins les cèl·lules del teixit que infecten. Aquest comportament, molt habitual en micoplasmes propis d'insectes, era considerat rar en cèl·lules de mamífers, fins al descobriment l'any 1992 de *Mycoplasma penetrans*, que com el seu nom indica, posseeix la capacitat d'introduir-se a l'interior cel·lular tant *in vivo* com *in vitro* [Lo, S. C., et al, 1992]. Posteriorment s'ha establert que altres espècies de micoplasma poden també localitzar-se en el citoplasma cel·lular, com per exemple *Mycoplasma pneumoniae* (Figura 1.4), però que aquesta capacitat depèn del tipus de cèl·lula epitelial a infectar [Yavlovich, A., et al, 2004]. És evident que l'interior cel·lular és un nínxol

extremadament favorable per a un micoplasma, ja que li permet evadir el sistema immunitari de l'hoste i els efectes dels possibles antibiòtics, tot establint la cronicitat típica descrita per a les infeccions del microorganisme.

1.1.1 Característiques principals de *Mycoplasma genitalium*

La present tesi centra el seu interès, com s'exposarà més endavant en aquesta introducció, en una glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium*.

Aquest micoplasma és el més petit que es coneix actualment, amb un genoma format únicament per 580 kb i amb aproximadament 480 regions codificadores de proteïnes, el qual fou seqüenciat completament per primera vegada l'any 1995 [Fraser, C. M., *et al*, 1995].

Mycoplasma genitalium està implicat de forma significativa en el desenvolupament de malalties del tracte urogenital com la uretritis no-gonocòccica, amb independència de *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoea* [Deguchi, T. i Maeda, S., 2002]. Es coneix que la transmissió sexual és la principal via de contagi per aquestes malalties [Keane, F. E., *et al*, 2000], entre les que es troben, a més de l'esmentada uretritis, la cervicitis, l'endometritis, la salpingitis, la malaltia inflamatòria pèlvica i certs tipus d'infertilitat. També es vincula *Mycoplasma genitalium* a altres malalties extra-genitourinàries, com ara l'artritis, la pneumònia, la progressió de la SIDA, la síndrome de fatiga crònica, l'encefalitis i algunes malalties autoimmunes [Taylor-Robinson, D., 2002].

Mycoplasma genitalium presenta una morfologia de tipus ampolla (veure Figura 1.3), amb una estructura en forma de punta anomenada organel·la terminal, la qual li permet l'adhesió a les cèl·lules de l'organisme hoste abans de la seva infecció. Si bé habitualment el micoplasma roman adherit a les cèl·lules que colonitza, s'ha demostrat que és capaç d'introduir-se a l'interior del seu citoplasma [Baseman, J. B., *et al*, 1995].

Com la resta de micoplasmes, el contingut en G+C del seu genoma és baix, amb un valor mitjà del 32 %, si bé també és irregular, assolint valors del 44 % per a les zones corresponents a l'ARN ribosòmic i del 52 % en els ARN de transferència [Fraser, C. M., *et al*, 1995]. Aquest baix contingut en G+C propicia l'ús majoritari del codó TGA per a l'aminoàcid triptòfan, en comptes de codificar el codó de parada universal. Cal dir, però, que l'esmentat aminoàcid també pot trobar-se representat pel codó TGG.

Pel que fa al metabolisme, *Mycoplasma genitalium* obté ATP mitjançant glucòlisi. Es troba mancat de les rutes de síntesi d'aminoàcids, àcids grassos, molts cofactors i les bases púriques i pirimidíniques per a la síntesi de l'ADN. També ha d'adquirir de l'entorn el colesterol que requereix la seva membrana plasmàtica per al manteniment de la seva fluïdesa [Razin, S. *et al*, 1998].

1.1.2 La membrana plasmàtica dels micoplasmes

En uns organismes com els micoplasmes, els quals no posseeixen una paret cel·lular que els aïlli de l'exterior, la membrana plasmàtica pren una rellevància especial, ja que totes les interaccions amb l'entorn tenen lloc a través seu.

La composició de la membrana plasmàtica dels micoplasmes presenta algunes particularitats si es compara amb la d'altres bacteris. La presència de proteïnes ancorades en ella és molt important, ja que representen entre un 60-70 % del total de la massa d'aquesta estructura cel·lular [Razin, S. i Hayflick, L., 2010].

Algunes d'aquestes proteïnes són transportadors que faciliten l'entrada dels metabòlits que l'organisme no pot sintetitzar degut a la manca de les corresponents rutes metabòliques. En el cas de *Mycoplasma genitalium* cal destacar que molts dels sistemes de transport presents en procariotes no han estat identificats en el seu genoma. Únicament alguns transportadors ABC, com el de fosfat o el de espermidina/putrescina es troben complets i d'altres, com el del fosfonat, el de Co o el de pèptids/Ni només presenten algunes parts de l'operó. Pel que fa als transportadors depenents de fosfoenolpiruvat (PTS), s'han identificat en el genoma de *Mycoplasma genitalium* aquells relacionats amb el transport de glucosa i de fructosa (dades obtingudes de la base de dades KEGG Pathway - www.genome.jp/kegg/pathway.html). La possibilitat que els sistemes de transport dels micoplasmes hagin evolucionat de forma divergent respecte la resta de procariotes explicaria la dificultat en la identificació de més sistemes, tot i que una altra hipòtesi per explicar-ne el baix nombre esgrimeix que els transportadors de micoplasma haurien perdut la seva especificitat per acceptar una àmplia gamma de substrats i disminuir-ne així la quantitat necessària [Razin, S. et al, 1998].

Un altre tret diferencial de la membrana dels micoplasmes és la quantitat de lipoproteïnes que hi és present, la qual és molt superior a la d'altres bacteris. Es coneix que aquestes actuen majoritàriament com a antígens de superfície i que experimenten variació antigènica.

Pel que fa al contingut lipídic, el qual representa entre un 20 - 30 % de la massa total [Razin, S. i Hayflick, L., 2010], les membranes dels micoplasmes contenen bàsicament fosfolípids, glicolípid i lípids neutres. La membrana d'*Acholeplasma laidlawii*, el micoplasma que s'ha emprat més extensivament per a l'estudi d'aquestes estructures, conté entre un 25 - 30 % de fosfolípids, en concret fosfatidilglicerol i difosfatidilglicerol. Ara bé, els lípids majoritaris, tot constituint un 60 % del total, són glucolípid i glucofosfolípids. Finalment, els lípids neutres representen menys d'un 10 % del contingut lipídic [Razin, S., 1978].

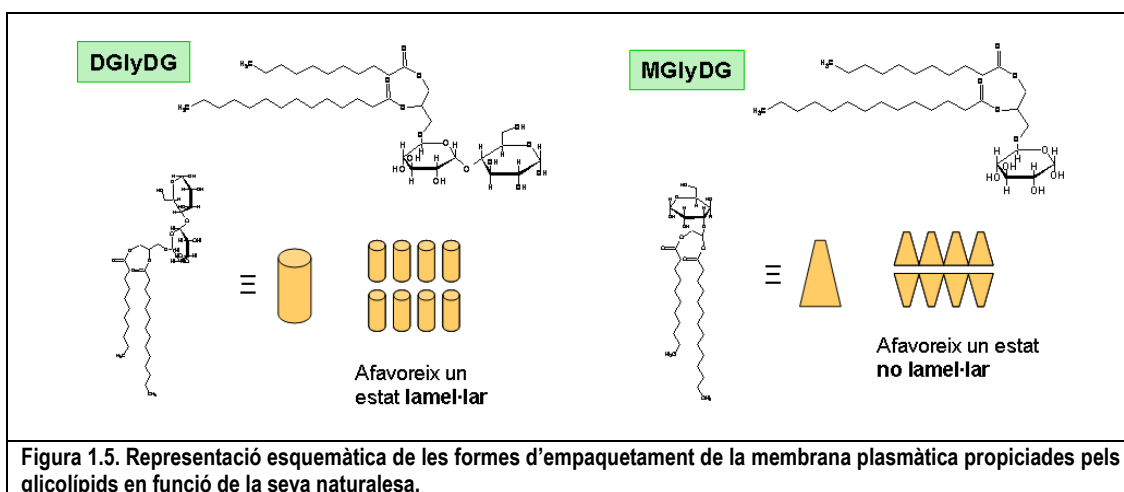
En general, els glicolípid representen un percentatge força elevat del total de lípids de la membrana dels micoplasmes, si bé existeixen algunes excepcions, com és el cas de *Mycoplasma hominis* pel qual no s'han descrit glicolípid en les seves membranes [Razin, S., 1978]. Una de les seves funcions és la d'actuar com a agents reguladors de la fluïdesa i l'estat cristal·lí de la membrana. Com s'ha exposat anteriorment, els micoplasmes són incapaçs de sintetitzar àcids grassos i, per tant, han d'obtenir-los de l'entorn. Aquesta dependència d'un subministrament exogen d'àcids grassos implica una major dificultat per regular les propietats de la membrana i mantenir l'homeòstasi cel·lular. Per tal de superar aquesta limitació, a més de l'acció dels glicolípid, molts

micoplasmes requereixen una font externa de colesterol, com és el cas de *Mycoplasma genitalium*, un fet únic entre organismes procariotes [Razin, S. *et al*, 1998]. Els glicolípid també posseeixen un rol immunogènic, tal com demostra un estudi publicat l'any 2007 sobre els glicolípid de *Mycoplasma pneumoniae*. En aquest treball es posa de manifest la seva relació amb els mecanismes de reconeixement del bacteri per part de l'hoste i la producció d'anticossos [Rosén Klement., M *et al*, 2007].

1.1.2.1 El paper dels glicolípid en la regulació de les propietats de la membrana plasmàtica

L'incapacitat de sintetitzar àcids grassos ha propiciat el desenvolupament d'un sistema de regulació de les propietats físiques de la membrana plasmàtica per part dels micoplasmes en el qual són clau els dos principals glicolípid d'aquests microorganismes: el monoglicosil diacilglicerol (MGlyDG) i el diglicosil diacilglicerol (DGlyDG).

Aquestes molècules són de caràcter amfipàtic, amb un cap polar constituït per la part sacarídica i una cua hidrofòbica formada pels àcids grassos. La seva presència a la membrana genera diferents formes d'empaquetament d'aquesta estructura, en funció de la naturalesa del glicolípid, tal com es representa esquemàticament a la Figura 1.5.



L'única unitat sacarídica que forma part del MGlyDG és la responsable que aquesta molècula formi part dels lípid que propicien un estat no lamel·lar de la membrana plasmàtica, en el qual aquesta presenta una fluïdesa major. En canvi, la suma d'una segona unitat sacarídica a la molècula de MGlyDG per rendir el segon glicolípid DGlyDG transforma aquest compost en un estimulador d'estats lamel·lars de la membrana plasmàtica, els quals es caracteritzen per donar un ordre i un empaquetament superior a l'estructura.

Un bon funcionament de la membrana plasmàtica requereix una cristallinitat determinada i un radi de curvatura espontània i una densitat de càrrega superficial constants. Aquestes característiques s'aconsegueixen quan a la bicapa lipídica existeix un equilibri entre components de caràcter lamel·lar i components de caràcter no lamel·lar, com ho són els glicolípid presentats. Per tant, el seu paper és molt important en la regulació de l'estat físic de les membranes dels micoplasmes, si bé cal dir que no són les úniques molècules que hi participen [Vikström, S. *et al*, 1999].

En *Acholeplasma laidlawii* les propietats de la membrana es troben regulades per la relació de concentracions entre el monoglicolíp i el diglicolíp [Rilfors, L., et al, 1993], tot i que també hi tenen un rol clau la longitud de les cadenes d'àcid gras i el seu grau d'insaturació. En aquest micoplasma es coneix que els enzims responsables de la síntesi dels esmentats glicolípid són dues glicosiltransferases associades a la membrana [Dahlqvist, A. et al, 1995], de les quals se n'expliquen les característiques i se'n comenta el funcionament més endavant en el capítol 5 de la present tesi.

1.2 Funcions dels glicolípid en altres organismes

1.2.1 Organismes fotosintètics oxigènics: plantes i cianobacteris

Els glicoglicolípids no són presents únicament a les membranes dels micoplasmes. De fet són molt abundants a la natura si es té en compte que constitueixen els principals components de les membranes dels cloroplasts de les cèl·lules vegetals i de les membranes dels cianobacteris. Així, els tilacoides dels cloroplasts contenen un 50 % de MGDG (monogalactosil diacilglicerol), un 30 % de DGDG (digalactosil diacilglicerol), entre un 5-10 % de SQDG (sulfoquinovosil diacilglicerol) i únicament un 10 % de PG (fosfatidilglicerol) [Dörmann, P. and Hözl, G., 2009]. Aquesta composició es conserva en els cianobacteris, reforçant la teoria endosimbiòtica, segons la qual una cèl·lula bacteriana amb capacitat fotosintètica va ser fagocitada per un avantpassat eucariota donant lloc a la primera cèl·lula vegetal [Hözl, G. and Dörmann, P., 2007].

La presència d'un nombre tan elevat de glicolípid només es dona en les membranes amb una funció en la fotosíntesi, fet que porta a pensar en un paper d'aquests compostos en l'esmentat procés més enllà de la seva funció estructural, la qual és molt semblant a la que s'ha descrit en *Acholeplasma laidlawii* [Dörmann, P. and Hözl, G., 2009]. En les membranes no fotosintètiques únicament és rellevant la presència de glicolípid en condicions de manca de fosfat, situació en la qual s'augmenta de forma molt important la síntesi de DGDG i SQDG i el primer s'exporta des dels tilacoides cap a les membranes exteriors al cloroplast. Sembla que la cèl·lula vegetal és capaç de substituir els fosfolípids per DGDG quan al medi no hi ha suficient fosfat disponible [Dörmann, P. and Hözl, G., 2009].

Un fet que crida l'atenció és la no presència, tant en cèl·lules vegetals com en cianobacteris, de glicolípid amb una molècula de glucosa a la part sacarídica. De fet, en els cianobacteris el MGDG s'obté per l'acció d'una epimerasa que té com a substrat el MGlcDG, el qual és el glicolípid que les cèl·lules sintetitzen en primer lloc. La preferència per la galactosa en els glicolípid podria implicar un paper d'aquest sucre en la fotosíntesi, el qual no podria realitzar la glucosa. En aquest sentit, la cristal·lització del fotosistema I de *S. elongatus*, un cianobacteri termòfil, revelà la presència d'una molècula de MGDG, a més de tres fosfolípids, unida a l'esmentat fotosistema [Jordan, P., et al, 2001]. En aquesta unió el grup hidroxil del C4 de la galactosa, el qual es troba en posició axial, forma un pont d'hidrogen amb el carbonil de l'enllaç amida de l'Ala562 i el conjunt s'estabilitza mitjançant la interacció hidrofòbica

dels C3, C4 i C5 de la galactosa amb la cadena alifàtica de la Val709. Una disposició estèrica com la aquí descrita no seria possible amb un anell de glucosa, ja que aquesta no disposa d'un hidroxil axial en el C4 ni tampoc presenta una cara hidrofòbica com la de la galactosa [Dörmann, P. and Benning, C., 2002].

D'altra banda, la complementació d'un doble mutant d'*Arabidopsis thaliana* incapaç de sintetitzar DGDG amb una glicosiltransferasa de *Chloroflexus* que li permet produir un nou glicolípid, β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -galactopiranosil diacilglicerol (GlcGDG) inexistent en el mutant, fa que aquest recuperi la mida normal de la planta salvatge i el seu ritme de creixement. També els cloroplasts recuperen la seva estructura i els tilacoides presenten una energia electroquímica equiparable a la de la planta normal. Totes aquestes característiques del mutant complementat indiquen que GlcGDG és capaç de reemplaçar DGDG pel que fa a les funcions estructurals requerides per a la formació de bicapes impermeables al pas d'ions i a la generació d'una força motriu de protons. En canvi, la síntesi del nou glicolípid no permet recuperar l'eficiència fotosintètica normal, ni el rendiment quàntic del fotosistema II, ni tampoc la resistència als danys causats per l'excès de llum, si bé els millora de forma significativa en comparació als valors del doble mutant. Aquest comportament indicaria que pigments, complexos proteics i altres cofactors implicats en la fotosíntesi han evolucionat envoltats d'una matriu formada principalment per galactolípid i això ha propiciat l'establiment d'unions i interaccions únicament possibles amb aquest sucre, els quals explicarien l'absència en els organismes fotosintètics de glucolípid [Hözl, G., et al, 2009].

El fotosistema I no és l'única estructura implicada en la fotosíntesi que es troba unida a glicolípid. La cristal·lització del complex captador de llum II (*LHC II – light harvesting complex II*) d'espínac [Liu, Z., et al, 2004] i de pèsol [Standfuss, J., et al, 2005] demostra la presència de molècules de DGDG unides a ell, les quals posseeixen una funció estabilitzadora de l'estructura. També el fotosistema II conté un elevat nombre de glicolípid units; en concret, sis molècules de MGDG, quatre de DGDG i tres de SQDG, a més d'una molècula de PG, a les quals se'ls adjudica la funció de permetre el muntatge del fotosistema i la de donar flexibilitat als polipèptids i cofactors que en formen part [Jones, M.R., 2007]. Finalment, es coneix que el MGDG té un paper important en el cicle de la xantofil·la, el qual té la funció de protegir la maquinària fotosintètica contra les espècies d'oxigen reactives [Latowski, D., et al, 2004] i que juntament amb el DGDG, són crucials en el *quenching* de la fluorescència de la clorofil·la [Moya, I., et al, 2001].

1.2.2 Organismes fotosintètics anoxigènics

La uniformitat en els glicolípid dels organismes fotosintètics oxigènics desapareix en entrar a classificar els glicolípid dels organismes que també realitzen la fotosíntesi però que no tenen com a donador d'electrons una molècula d'aigua, sinó compostos de sofre, H₂ o altres molècules orgàniques. Són els bacteris fotosintètics anoxigènics i es classifiquen en quatre tipus diferents: els bacteris verds del sofre, els bacteris verds no del sofre, els bacteris porpres del sofre i els bacteris porpres no del sofre.

Alguns membres dels bacteris verds no del sofre, com *Chloroflexus aurantiacus*, contenen, talment com plantes i cianobacteris, grans quantitats de MGDG a les seves membranes, si bé en aquest cas el galactolípid es troba acompanyat per β Glc(1 \rightarrow 6) β GalDG i no es descriu la presència de SQDG [Hözl, G. and Dormann, P., 2007]. Pel que fa als bacteris verds del sofre, també s'ha identificat MGDG com un dels glicolípid importants, si bé es troba

acompanyat per altres glicolípid no determinats que contenen ramnosa, glucosa, galactosa i altres sucres no caracteritzats en el seu cap polar. SQDG no ha estat descrit en cap d'aquests bacteris [Hözl, G. and Dormann, P., 2007].

Pel que fa als bacteris porpres no del sofre, la seva composició lipídica varia considerablement entre espècies. Algunes d'elles no presenten glicoglicerolípid i altres només els sintetitzen sota determinades condicions. En aquests casos, els glicolípid tenen estructures diferents als de les plantes, com per exemple el β Gal β GalDG, on la galactosa terminal posseeix una configuració oposada a la de DGDG, o bé són compostos completament diferents com és el cas de l' α -glucuronosil diacilglicerol de *Blastochloris viridis* [Hözl, G. and Dormann, P., 2007]. També cal dir que en aquests bacteris els àcids grassos dels glicolípid són molt variables i diferents respecte els de plantes i cianobacteris. La presència de SQDG és dependent de l'espècie.

Finalment, els dos grups que pertanyen als bacteris porpres del sofre són oposats pel que fa a la presència en les seves membranes de glicolípid. Els del gènere *Ectothiorhodospiraceae* es troben totalment mancats de glicolípid, mentre que en els del gènere *Chromatiaceae* es distingeixen MGlcDG, oligoglicerolípid format per una unitat de glucosa i un o dos residus de manosa i SQDG [Hözl, G. and Dormann, P., 2007].

1.2.3 Bacteris no fotosintètics

En aquest grup d'organismes és on es troba la major diversitat d'estructures glicosídiques de tots els glicolípid presents a la natura. Tanmateix galactolípid com els de les plantes i cianobacteris no s'hi troben representats. L'àmplia gamma de compostos deriva de l'existència d'enllaços glicosídics (1→2), (1→3), (1→4) i (1→6) i de sucres amb els carbonis anomèrics tant amb configuració α com amb configuració β , tal com es mostra a la Taula 1.2. Cal dir, però, que la part hidrofòbica dels glicolípid bacterians és força simple, amb majoria d'àcids grassos saturats o monoinsaturats [Hözl, G. and Dormann, P., 2007].

En els bacteris gram-positiu la funció dels glicolípid és la de servir com a element d'ancoratge dels àcids teicoics a la membrana, constituint els anomenats àcids lipoteicoics. Aquests formen part de la paret bacteriana, tal com s'aprecia en la representació esquemàtica de la Figura 1.6. La paret bacteriana gram-positiva és una matriu polianiónica, que a més dels àcids lipoteicoics conté peptidoglicà i àcids teicoics, semblants als lipoteicoics però ancorats al peptidoglicà. Les seves funcions es troben relacionades amb l'elasticitat, la porositat, la tracció i el flux electrostàtic de l'embolcall cel·lular. No tan sols és necessària per mantenir l'homeòstasi de cations metàl·lics sinó que facilita el transport de ions en general, nutrients, proteïnes i antibiòtics. La paret bacteriana també és responsable de la presentació a l'entorn de les peptidoglican hidrolases, anomenades autolisines, i de les adhesines [Neuhaus, F.C. and Baddiley, J., 2003].

Taula 1.2. Distribució dels glicoglicerolípid en bacteris no fotosintètics.

Organisme	Principals glicoglicerolípid
Firmicutes (Bacteris Gram-positiu)	
<i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i>	β Glc(1 \rightarrow 6) β GlcDG
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	β Glc(1 \rightarrow 4) β -N-acilglucosaminidialciglicerol
<i>Planococcus</i>	SQDG
<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>	α Gal(1 \rightarrow 2) α GlcDG
<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Acholeplasma</i>	α GlcDG, α Glc(1 \rightarrow 2) α GlcDG
Actinobacteria (Bacteris Gram-positiu de contingut G+C alt)	
<i>Micrococcaceae</i> , <i>Microbacteriaceae</i>	Diferents derivats acilats de α Man(1 \rightarrow 3) α Man-glicerol o α Glc(1 \rightarrow 3) α Man-glicerol
<i>Nocardiopsaceae</i> , <i>Pseudonocardioaceae</i>	α Glc(1 \rightarrow 3) α Glc-acil-alquil-glicerol
<i>Propionibacterium</i>	α GlcADG, α Glc(1 \rightarrow 4) α GlcADG
<i>Streptomyces</i>	β GalDG, β Gal(1 \rightarrow 2) β GalDG, β Gal(1 \rightarrow 2) β Gal(1 \rightarrow 2) β GalDG
<i>Bifidobacterium</i>	
Deinococcus Thermus	
<i>Deinococcus radiodurans</i>	α GlcDG
Thermotogae	
<i>Thermotoga maritima</i>	α Glc(1 \rightarrow 4) α GlcDG
Alphaproteobacteria	
Bacteris de la col-i-flor i família	
<i>Brevundimonas</i> , <i>Hyphomonas</i> , <i>Maricaulis</i> , <i>Woodsholea</i> , <i>Caulobacter</i>	α GlcDG, α GlcADG, α Glc(1 \rightarrow 4) α GlcADG, SQDG, TAU (amida de l'àcid tàuric)
Rhizobiales	
<i>Rhizobium</i>	α Glc(1 \rightarrow 3) α ManDG
<i>Sinorhizobium</i>	SQDG
Spirochaetes	
<i>Treponema</i> , <i>Spirochaeta</i> , <i>Serpula</i> , <i>Borrelia</i>	α GalDG, α GlcDG

Informació extreta de [Hölzl, G. and Dormann, P., 2007].

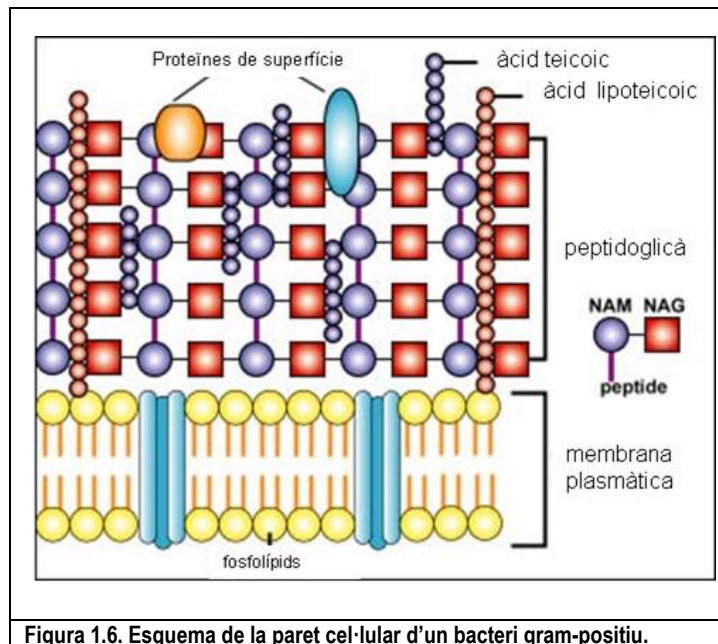
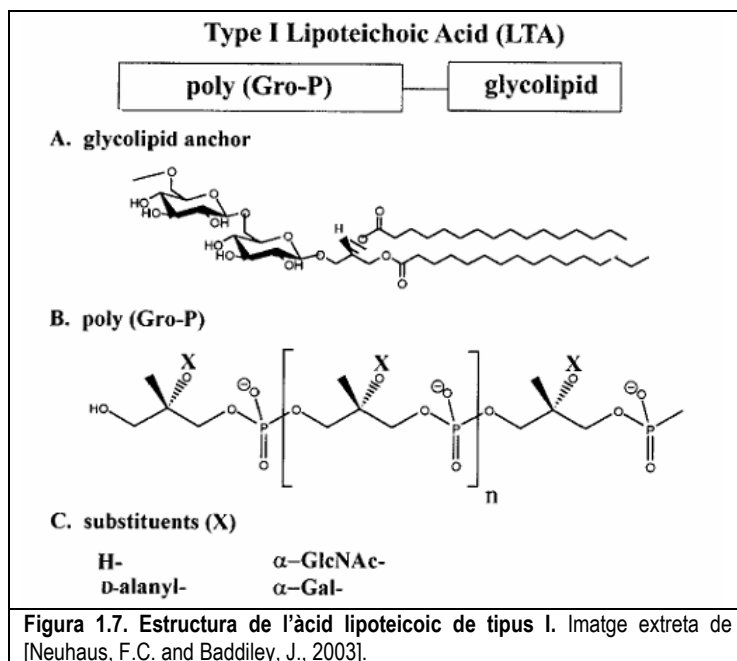


Figura 1.6. Esquema de la paret cel·lular d'un bacteri gram-positiu.

Els àcids lipoteicoics consten de dues parts diferenciades: el glicolípid que funciona com a àncora a la membrana i un polímer de glicerolfosfat (poli Gro-P) amb residus D-alanina esterificats a la posició *sn*-2 del glicerol. Ara bé, la diversitat d'estructures fa que s'hagin establert tres tipus diferents d'àcids lipoteicoics, I, II i III, si bé el més general ja que es troba en *Staphylococcus*, *Bacillus* i *Streptococcus* és el de tipus I descrit en la Figura 1.7. En aquest cas el disacàrid present en el glicolípid és una unitat de Glc- β (1 \rightarrow 6)-Glc.



En els àcids lipoteicoics de tipus II i III, el polímer de glicerolfosfat inclou a més unitats de galactosa, dues en el cas del tipus II (Gal-Gal-Gro-P) i una en el cas del tipus III (Gal-Gro-P) [Neuhaus, F.C. and Baddiley, J., 2003].

Cal dir que els bacteris gram-negatiu no apareixen en aquest recull d'informació ja que no disposen de glicoglicerolípid en les seves parets cel·lulars. Aquestes contenen els anomenats lipopolisacàrids, però la seva estructura és diferent a la dels àcids lipoteicoics, si bé pot considerar-se que les funcions d'ambdues molècules són equivalents.

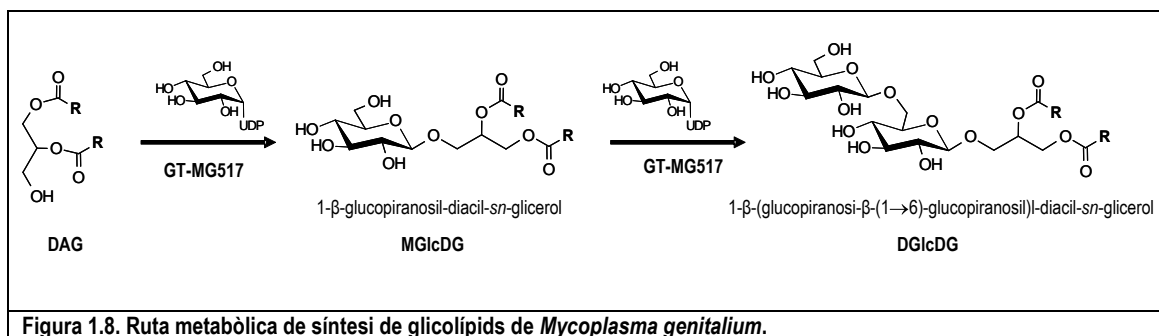
1.3 Glicosiltransferases de *Mycoplasma genitalium*: possibles dianes terapèutiques

La major part dels estudis realitzats sobre membranes de micoplasma, els quals es van iniciar als anys 60 del segle passat, han utilitzat com a organisme de referència *Acholeplasma laidlawii*. Ara bé, en els últims anys s'ha ampliat l'espectre d'espècies estudiades pel que fa a la síntesi dels seus glicolípid amb la publicació d'un estudi centrat en *Mycoplasma pneumoniae* [Rosén Klement, M. *et al*, 2007], el micoplasma més pròxim filogenèticament a *Mycoplasma genitalium*. No és clar que la composició de les membranes pugui generalitzar-se per a totes les espècies de micoplasma. Tot i això, el paper dels glicolípid com a agents reguladors de les seves característiques és quelcom extrapolable als micoplasmes que els contenen a les bicapes lipídiques, com és el cas de *Mycoplasma genitalium*.

Prèviament a l'esmentat treball sobre *Mycoplasma pneumoniae*, s'havia iniciat al Laboratori de Bioquímica del Departament de Bioenginyeria de l'Institut Químic de Sarrià (Universitat Ramon Llull), en col·laboració amb el Laboratori de Biologia Molecular de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona un projecte d'estudi de *Mycoplasma genitalium* amb el finançament del Ministeri d'Educació i Ciència espanyol (BIO2001-2064-C02-02 i BFU2004-06377-C02-02).

Com s'ha comentat anteriorment, aquest micoplasma és el que posseeix un genoma més petit de tots els *Mollicutes* i per aquest motiu, és subjecte de molts estudis sobre el concepte de cèl·lula mínima i conjunt mínim de gens necessaris per a la vida, els quals es comenten breument en el capítol 2 del present treball.

Ara bé, l'estudi desenvolupat en el Laboratori de Bioquímica de l'IQS se centra en el metabolisme de glicolípid d'aquest micoplasma. Inicialment es va establir que *Mycoplasma genitalium* posseeix dos glicolípid en les seves membranes: monoglicosil diacilglicerol i diglicosil diacilglicerol i, per tant, posseeix una ruta metabòlica capaç de sintetitzar-los amb un mínim de dues activitats glicosiltransferasa. L'estudi bioinformàtic del genoma del micoplasma va revelar que el bacteri només conté tres possibles gens que codifiquin per enzims d'aquest tipus, *mg025*, *mg060* i *mg517*, els quals es van clonar i expressar en *E. coli*, després de la corresponent adaptació de codó necessària degut a l'ús particular del codó TGA per part de *Mycoplasma genitalium* comentat anteriorment en aquesta Introducció. Aquest treball [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007] va establir que de les tres possibles glicosiltransferases, únicament una, corresponent al producte del gen *mg517* i anomenada en la present tesi GT-MG517, és la responsable de la síntesi dels dos glicolípid, tal com es mostra a la Figura 1.8.



Així doncs, és un únic enzim el que presenta tant l'activitat monoglicosil diacilglicerol sintasa com l'activitat diglicosil diacilglicerol sintasa. El fet que *Mycoplasma genitalium*, a diferència del més evolucionat *Acholeplasma laidlawii*, hagi combinat les dues activitats sintasa en una sola proteïna és un exemple més de la economitització de gens que ha experimentat aquest organisme mínim. Així doncs, la regulació de la ratio entre els dos principals glicolípid i, per tant, de les propietats físiques de la membrana, recau en el control d'un únic enzim, ja que a partir d'un compost que propicia estats no lamel·lars de la membrana, el micoplasma incorpora una segona unitat sacàridica i forma una molècula amb la tendència contrària. Aquest comportament, com es comenta àmpliament en el capítol 5 de la present tesi, és equivalent al de *Mycoplasma pneumoniae* [Rosén Klement, M. *et al*, 2007].

Cal dir que degut a la dificultat d'obtenir grans quantitats de biomassa de *Mycoplasma genitalium*, fins al moment ha estat impossible establir la naturalesa real del sucre que el microorganisme incorpora als seus glicolípid *in vivo*. L'anàlisi dels productes sintetitzats, realitzat tant a partir de la seva purificació de les membranes de cèl·lules d'*E. coli* les quals expressaven GT-MG517 com a partir d'una reacció catalitzada per l'enzim purificat en presència del donador UDP-Glc i de l'acceptor DOG, ha permès determinar que la incorporació del sucre té lloc amb inversió de configuració en ambdues reaccions de glicosilació i que l'enllaç que es forma entre les dues unitats sacàridiques presenta la configuració $\beta(1\rightarrow6)$ [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007].

Així doncs i considerant l'explicat en els paràgrafs anteriors, quelcom tan essencial com les propietats de la membrana plasmàtica podrien trobar-se regulades en *Mycoplasma genitalium* per l'acció d'un únic enzim, GT-MG517. Aquest, a partir de la modulació en tot moment de les quantitats relatives dels dos glicolípid seria el responsable del manteniment de les condicions d'homeòstasi cel·lular que propicia la membrana, la qual també actua com a estructura de suport de moltes proteïnes essencials en els processos de citadherència, motilitat i virulència del microorganisme.

Davant d'aquesta possibilitat, sorgeix en el Laboratori de Bioquímica de l'IQS la idea d'emprar la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* com a diana terapèutica per al desenvolupament d'antibiòtics capaços d'eradicar infeccions causades per micoplasmes. Aquesta opció és clara, més quan es té en compte que les cèl·lules eucariotes, hostes del bacteri, no posseeixen glicolípid del tipus glicoglicerolípid en les seves membranes i, per tant, glicosiltransferases amb aquesta especificitat no es troben presents en elles. El bloqueig dels enzims necessaris per a la modulació de la quantitat i identitat dels glicolípid presents a la membrana plasmàtica del micoplasma seria fatal per al microorganisme.

1.4 Aplicació industrial dels glicolípid

Més enllà de l'interès de la glicosiltransferasa GT-MG517 com a diana terapèutica per a combatre les infeccions causades per *Mycoplasma genitalium*, en els últims anys s'ha incrementat la necessitat d'alternatives de producció de biosurfactants, molècules de caràcter amfifílic entre les que s'inclouen els glicolípid.

Aquests compostos es caracteritzen per posseir dues parts diferenciades: una zona hidrofòbica composta per una cadena hidrocarbonada llarga, lineal o ramificada, d'àcid gras, la qual pot incloure residus hidroxil; i una zona hidrofílica formada per un carbohidrat, un aminoàcid, un pèptid cíclic o residus fosfat, àcid carboxílic o hidroxil [Rahman, P. i Gakpe, E., 2008].

Els biosurfactants són produïts per microorganismes i constitueixen la versió biodegradable, no tòxica i mediambientalment favorable dels compostos coneguts com a surfactants, és a dir, molècules que per les seves característiques poden reduir la tensió superficial existent entre dues superfícies en contacte i reduir la concentració miscel·lar crítica (CMC) tant de solucions aquoses com de mesclures d'hidrocarburs. Moltes indústries fan ús de surfactants en els seus processos, com ara la indústria tèxtil, paperera, de plàstics, de polímers, cosmètica, farmacèutica, d'alimentació o de fabricació de maquinària, si bé la font d'aquests compostos és el petroli [Kitamoto, D., *et al*, 2002]. Per tant, els biosurfactants constitueixen una alternativa clara als surfactants químics gràcies a les seves propietats úniques com unes condicions de producció suaus, una toxicitat molt baixa, una elevada biodegradabilitat i l'evident compatibilitat mediambiental degut al seu origen.

Els biosurfactants són produïts extracel·lularment o com a components de les membranes cel·lulars de llevats, bacteris i fongs filamentosos. Segons l'estructura de la seva part hidrofílica, els biosurfactants es classifiquen en quatre tipus diferents: glicolípid, fosfolípid, lipoproteïnes o lipopèptids i polímers [Rahman, P. i Gakpe, E., 2008].

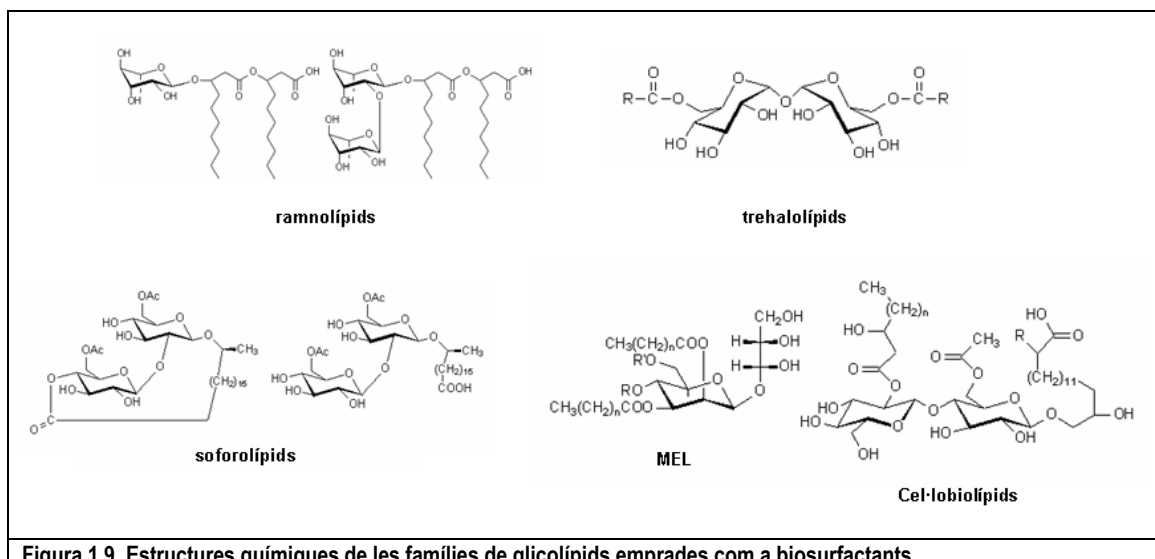


Figura 1.9. Estructures químiques de les famílies de glicolípid emprades com a biosurfactants.

Els glicolípid han estat tradicionalment els biosurfactants més emprats i més estudiats, degut que els seus nivells de producció són més elevats que els dels altres tipus de biosurfactants. Les tres famílies de glicolípid més importants en aquesta aplicació industrial són els ramnolípid, derivats del monosacàrid ramnosa i produïts per bacteris de la família de les *Pseudomonas*; els trehalolípid, derivats del disacàrid trehalosa i produïts per bacteris del tipus *Mycobacteria*; i els soforolípid, derivats del disacàrid soforosa i produïts per espècies de fongs com *Candida bombicola*. Altres glicolípid inicialment menys emprats però actualment en alça són els MEL (manosileritriol lípid), els quals són produïts pel fong *Candida antarctica* i glicolípid derivats de la cellobiosa [Kitamoto, D., *et al*, 2002]. A la Figura 1.9 es presenten les estructures químiques de les principals famílies de glicolípid utilitzades com a biosurfactants.

L'elevada afinitat que presenten els ramnolípid per molècules orgàniques hidrofòbiques ha permès el seu ús en l'eliminació de contaminants hidrofòbics de sòls contaminats [Rahman, K. S. M., *et al*, 2006]. Per la seva banda, els soforolípid presenten activitat biocida [Lang, S., *et al*, 1989], fet que els fa útils com a agents bacteriostàtics o com a components de cosmètics.

Aquests són només dos exemples de l'aplicació dels glicolípid com a biosurfactants en diferents indústries. L'observació de les estructures que es descriuen a la Figura 1.9 permet la seva comparació amb les estructures dels glicolípid produïts per *Mycoplasma genitalium* i, en concret, per la seva glicosiltransferasa GT-MG517, les quals s'han presentat a la Figura 1.8. Com s'ha comentat, els glicolípid que s'utilitzen com a biosurfactants s'obtenen directament de la seva extracció de cultius dels microorganismes que els produeixen. Aquest fet, que els fa més econòmics en comparació amb els surfactants derivats del petroli, també suposa un problema degut a la dependència de la producció de glicolípid per part dels microorganismes de les condicions en les quals té lloc el seu creixement. La possibilitat de produir els esmentats glicolípid de forma aïllada als bacteris o fongs que els generen és difícil en la majoria dels casos, ja que les rutes metabòliques que els sintetitzen *in vivo* són desconegudes o molt complicades i la seva implementació de forma industrial significaria la purificació de diversos enzims i l'optimització de les condicions de reacció de diversos passos de síntesi [Kitamoto, D., *et al*, 2002].

En canvi, en el cas de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* GT-MG517, el seu aïllament i la seva aplicació a la producció dels dos glicolípid de les membranes del microorganisme podria ser factible a nivell industrial, sempre i quan es disposés d'un sistema d'expressió i purificació amb rendiments satisfactoris i d'un coneixement del seu mecanisme d'acció, ambdues coses àmpliament estudiades en la present tesi. Un avantatge complementari de l'ús d'un enzim aïllat seria la possibilitat de reutilitzar-lo un nombre determinat de vegades, suposant un estalvi respecte la necessitat actual de cultivar cada vegada el microorganisme que sintetitza el glicolípid d'interès.

Ara bé, cal dir que les glicosiltransferases no són enzims de fàcil implementació industrial, ja que en general són inestables i treballen amb substrats de preus elevats, com és el cas dels sucres activats amb un nucleòtid, substrats de les glicosiltransferases de tipus Leloir com és el cas de GT-MG517. Per aquest motiu una alternativa per a la producció de glicolípid d'alt valor afegit és la generació de soques de bacteris superproductores d'aquests compostos a partir de la introducció de les rutes de síntesi necessàries i de la modificació del metabolisme propi de la soca en qüestió, és a dir, l'ús de l'enginyeria metabòlica amb finalitats industrials.

1.5 Glicosiltransferases: classificació i mecanisme d'acció

Tal com s'ha posat de manifest en els punts previs d'aquesta *Introducció*, ja sigui com a dianes terapèutiques o com a enzims amb possibles aplicacions industrials, les glicosiltransferases són proteïnes que desperten un ampli interès dins la comunitat científica.

Les glicosiltransferases s'encarreguen de la formació d'enllaços glicosídics i, juntament amb els altres enzims amb activitats relacionades amb els glicans, com les glicosidases, les glican fosforilases i les liases, són responsables de l'enorme complexitat d'estructures sacarídiques existents a la natura. La comprensió total de la funció que aquestes desenvolupen i dels seus mecanismes de síntesi són els dos principals objectius de la glicobiologia. Ara bé, així com per a les glicosidases s'han elucidat molts dels detalls del seu funcionament, encara manca molta informació sobre el mecanisme d'acció i la relació existent entre l'activitat, l'especificitat pels substrats i l'estructura que presenten les glicosiltransferases. Per tant, qualsevol treball que impliqui l'aportació de nous coneixements representa una magnífica oportunitat d'ampliar el saber sobre aquests enzims essencials en la natura.

1.5.1 Reacció de transglicosilació

La reacció que catalitzen les glicosiltransferases és la transferència d'una unitat glicosídica activada des d'un substrat donador a una molècula acceptora, la qual pot ser un oligosacàrid, un lípid, una proteïna i compostos com esteroides, flavanones, bilirubina, carotens, etc, els quals es trobin glicosilats. Tot i que habitualment l'esmentada transferència té lloc sobre l'oxigen d'un residu hidroxil, donant lloc a un enllaç O-glicosídic, també poden donar-se glicosilacions sobre àtoms de nitrogen o de sofre. Segons la natura del donador que utilitzen, les glicosiltransferases

es classifiquen en enzims tipus Leloir i tipus no Leloir. Els primers i més abundants empen monosacàrids activats amb nucleòtids, mentre que en els segons el grup activador del sucre és un fosfat.

En funció del nombre d'unitats sacarídiques que incorporen a la molècula acceptora, les glicosiltransferases poden ser processives, si addicionen múltiples residus de forma consecutiva, o no processives, les quals catalitzen la transferència d'un únic monosacàrid a l'acceptor. Existeix certa controvèrsia entorn a la nomenclatura usada en aquesta última classificació, ja que el concepte de processivitat es troba relacionat amb l'alliberament o no al medi del producte format després de la reacció enzimàtica, abans de la incorporació d'una nova unitat sacarídica. Els enzims que acoblen diverses unitats sense permetre l'alliberament dels productes intermedis actuen de forma processiva; al contrari dels que a cada pas de síntesi alliberen el producte i capturen un nou substrat per a continuar la seva acció, els quals actuen de manera no processiva. Per tant, la classificació més correcta de les glicosiltransferases segons el nombre de residus que incorporen al seu substrat acceptor i sense considerar què ocorre en el centre actiu de l'enzim després de la reacció seria la diferenciació entre glicosiltransferases seqüencials i no seqüencials.

El mecanisme que empen les glicosiltransferases tipus Leloir per dur a terme la reacció de transglicosilació no és el mateix en tots els casos, ja que algunes inverteixen la configuració del carboni anomèric del sucre involucrat en la reacció, mentre que d'altres la mantenen invariable, tal com es mostra en la Figura 1.10.

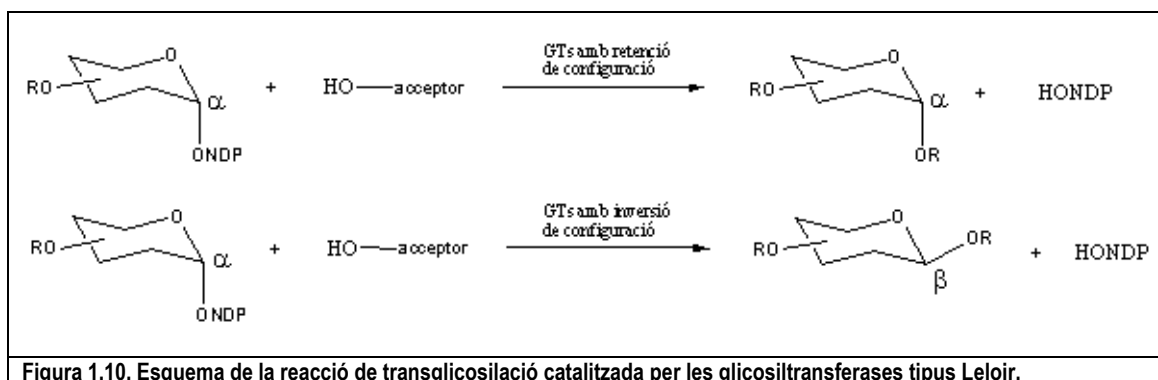
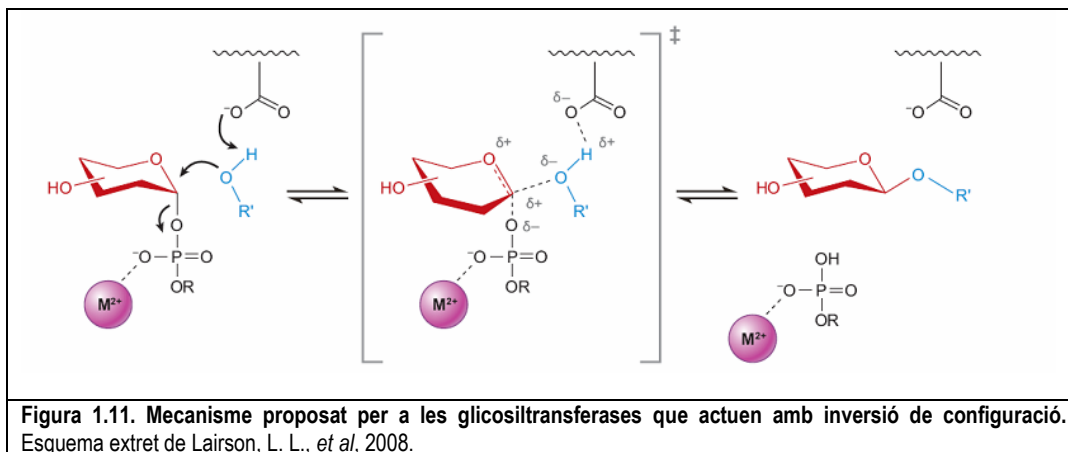


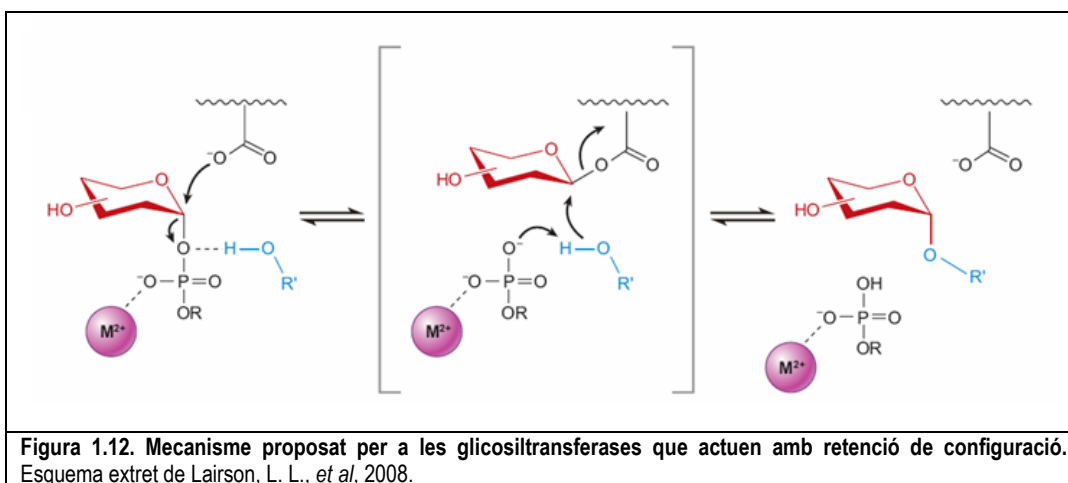
Figura 1.10. Esquema de la reacció de transglicosilació catalitzada per les glicosiltransferases tipus Leloir.

1.5.2 Mecanismes de catàlisi

Per analogia amb les glicosidases, els mecanismes de reacció de les quals han estat àmpliament estudiats i es disposa de nombroses evidències experimentals que els corroboren, s'han proposat dos mecanismes d'actuació per a les glicosiltransferases. Per aquelles que actuen amb inversió de configuració en el carboni anomèric del sucre, es proposa un mecanisme amb una única etapa de reacció i un estat de transició de caràcter oxocarboquínic, tal com es presenta en la Figura 1.11.



Tot i que les proves experimentals que donen suport a aquest mecanisme no són moltes, sembla probable la presència d'un estat de transició oxocarbocatiònic i el trencament de l'enllaç glicosídic abans de l'atac nucleòfil de l'acceptor [Murray, B. W. *et al*, 1997]. Per tant, es tractaria d'una substitució nucleòfila intermitja entre el tipus S_N2 i el tipus S_N1 . A més, per algunes glicosiltransferases s'ha identificat el residu del centre catalític que duu a terme el paper de base i la seva mutagènesi ha rendit un mutant amb una activitat molt baixa [Zhang, Y. *et al*, 1999] o completament nul·la [Garinot-Schneider, C., *et al*, 2000]. D'altra banda, moltes glicosiltransferases amb un mecanisme d'inversió de configuració requereixen un catió divalent, ja sigui Mn^{2+} o Mg^{2+} , per a la seva activitat. Aquest és coordinat per l'anomenat motiu DXD i facilita la sortida del nucleòsid difosfatat mitjançant l'estabilització de la càrrega negativa que es desenvolupa al llarg de l'eliminació del grup sortint [Lairson, L. L., *et al*, 2008]. Evidentment existeixen excepcions a aquest requeriment, com ara les sialiltrasferases independents d'ió metàl·lic [Chiu, C., *et al*, 2004] i la β -1,6-GlcNAc transferasa C2GnT-L [Pak, J. E., *et al*, 2006] les quals utilitzen grups hidroxil de residus de tirosina o aminoàcids bàsics per tal d'estabilitzar electrostàticament els grups fosfat sortints.



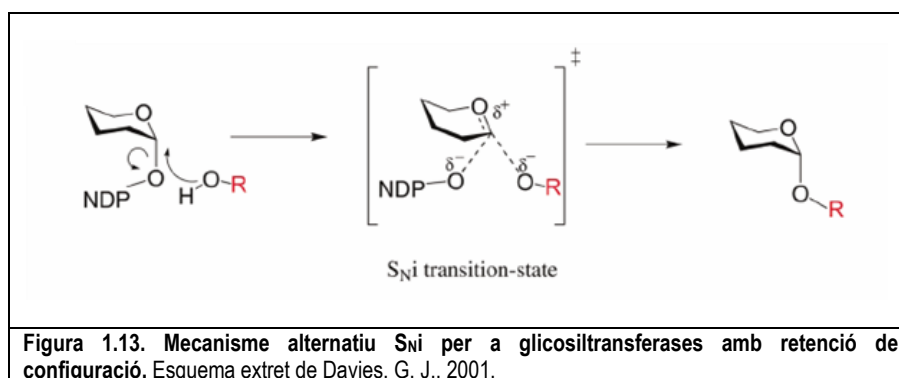
Pel que fa a les glicosiltransferases que actuen amb retenció de configuració en el carboni anomèric del sucre que transfereixen, s'ha proposat per analogia amb les glicosidases un mecanisme de doble desplaçament [Saxena, I. M. *et al*, 1995; Zechel, D.L. and Withers, S.G., 2000], en el qual es forma un intermedi covalent glicosil-enzim. Aquesta proposta requereix l'existència d'un residu posicionat de forma adequada en el centre actiu de la glicosiltransferasa, per tal que pugui actuar com a nucleòfil en la formació de l'esmentat intermedi, tal com es pot veure a la Figura 1.12.

També necessita un catió divalent o un residu carregat positivament per prendre el paper d'àcid de Lewis i un catalitzador de caràcter bàsic per tal d'activar el grup hidroxil de l'acceptor de cara a l'atac nucleòfil, aquest últim rol jugat probablement pel propi grup sortint difosfat.

En el nostre grup es publicà l'any 2006 un treball els resultats del qual donaven suport al mecanisme de doble desplaçament [Monegal, A. and Planas, A., 2006]. En aquest estudi es realitzà el rescat químic d'un mutant inactiu de l' α -(1 \rightarrow 3)-glicosiltransferasa bovina, enzim encarregat de la síntesi de l'epítot α -Gal clau en l'èxit dels xenotransplants. A l'esmentat enzim se li mutà el residu proposat com a nucleòfil en la reacció de catàlisi, el Glu317 per una Ala, i es confirmà la seva inactivitat. En realitzar la reacció en presència d'un nucleòfil exogen com l'azida i suficientment petit com per col·locar-se en la cavitat deixada per l'eliminació del Glu, l'activitat de l'enzim es recuperà. L'aïllament de β -D-galactosilazida com a producte de la reacció concordaria amb el mecanisme de doble desplaçament, ja que l'azida hauria actuat de nucleòfil i l'esmentat producte seria equivalent a l'intermedi glicosil-enzim.

Fins molt recentment aquesta era una de les poques evidències experimentals que recolzaven el mecanisme de doble desplaçament, ja que en algunes de les estructures cristal·logràfiques de glicosiltransferases amb retenció de configuració disponibles, com ara la de la LgtC de *Neisseria meningitidis* [Persson, K., *et al*, 2001], no poden identificar-se a partir del seu posicionament tridimensional els dos residus catalítics necessaris segons el mecanisme. A més, el fet que tots els intents de captura de l'intermedi glicosil-enzim no haguessin donat fruits va fer que l'any 2001 es proposés un mecanisme de catàlisi alternatiu per a les glicosiltransferases que actuen amb retenció de configuració, l'anomenat mecanisme S_Ni [Persson, K., *et al*, 2001] o mecanisme de retorn intern.

Químicament el mecanisme S_Ni és poc probable donat que en el procés el nucleòfil ataca per la mateixa cara per la qual té lloc la marxa del grup sortint i el conjunt s'estabilitza gràcies a la formació d'un parell iònic (Figura 1.13).



Ara bé, si la reacció de transglicosilació ocorre mitjançant un mecanisme S_Ni , no es forma mai un intermedi glicosil-enzim, fet que justificaria l'impossibilitat de la seva detecció. Podria dir-se que la comunitat científica ha donat certa rellevància a aquest mecanisme degut bàsicament a la manca d'evidències experimentals que donin suport a la hipòtesi més realista estèricament i entròpica del mecanisme de doble desplaçament.

Tanmateix, a finals del 2010 ha aparegut un treball basat en les glicosiltransferases que sintetitzen els antígens A i B que determinen els grups sanguinis, GTA i GTB, en el qual s'ha aconseguit la detecció de l'intermedi glicosil-enzim mitjançant espectrometria de masses [Soya, N. *et al*, 2010]. En aquest treball s'han obtingut mutants d'ambdós enzims en els quals el possible Glu nucleòfil s'ha substituït per una Cys i s'ha demostrat que els sucres dels donadors romanen units a la proteïna en absència d'un acceptor, però que quan s'addiciona aquest al medi, el conjunt evoluciona cap al producte esperat, indicant la competència catalítica de l'intermedi.

En l'anàlisi de les implicacions que genera aquest resultat cal considerar que totes les glicosiltransferases per les quals es presenten clares evidències d'un mecanisme de doble desplaçament (α GalT, GTA i GTB) formen part de la mateixa família de glicosiltransferases, la GT6. Per tant i com a mínim en aquesta família, existeix un residu correctament orientat en l'estructura per actuar com a nucleòfil. En altres famílies on els seus membres també realitzen la transglicosilació amb retenció de configuració en les quals no s'ha pogut detectar l'esmentat residu, podria ocórrer un canvi conformacional en el moment de la unió del substrat donador en el centre actiu que posicionés correctament els residus per a un mecanisme de doble desplaçament o bé podria donar-se en aquestes un mecanisme alternatiu de tipus S_Ni [Soya, N. *et al*, 2010].

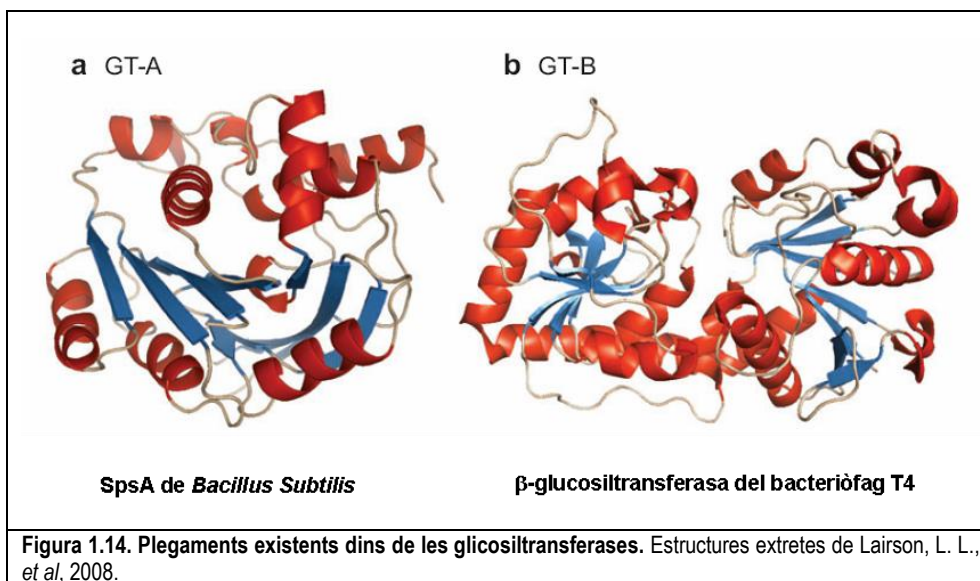
Per tant, tot i els últims avanços en l'elucidació del mecanisme d'acció de les glicosiltransferases amb retenció de configuració, encara són necessaris més resultats que impliquin enzims d'altres famílies que aportin llum a aquesta qüestió clau per a la glicobiologia.

1.5.3 Classificació

Les glicosidases, enzims encarregats de la hidròlisi d'enllaços glicosídics i, per tant, oposats en funció a les glicosiltransferases són enzims modulars, és a dir, presenten una organització en dominis, els quals poden realitzar funcions diferents dins de la reacció d'hidròlisi. L'estudi d'aquests enzims es troba més avançat que el de les glicosiltransferases i el coneixement de moltes de les seves particularitats ha fet possible la creació d'una classificació que organitza les glicosidases en diferents famílies.

Per analogia a aquestes últimes es va crear una classificació que agrupa les glicosiltransferases conegudes en famílies, si bé aquesta es basa únicament en les similituds en la seqüència d'aminoàcids de la proteïna existents entre elles [Cambell, J. A., *et al*, 1997]. L'esmentada classificació és d'accés lliure (www.cazy.org) i plenament dinàmica, ja que s'actualitza contínuament amb noves famílies i reorganització de les ja existents a partir de noves dades generades per la comunitat científica.

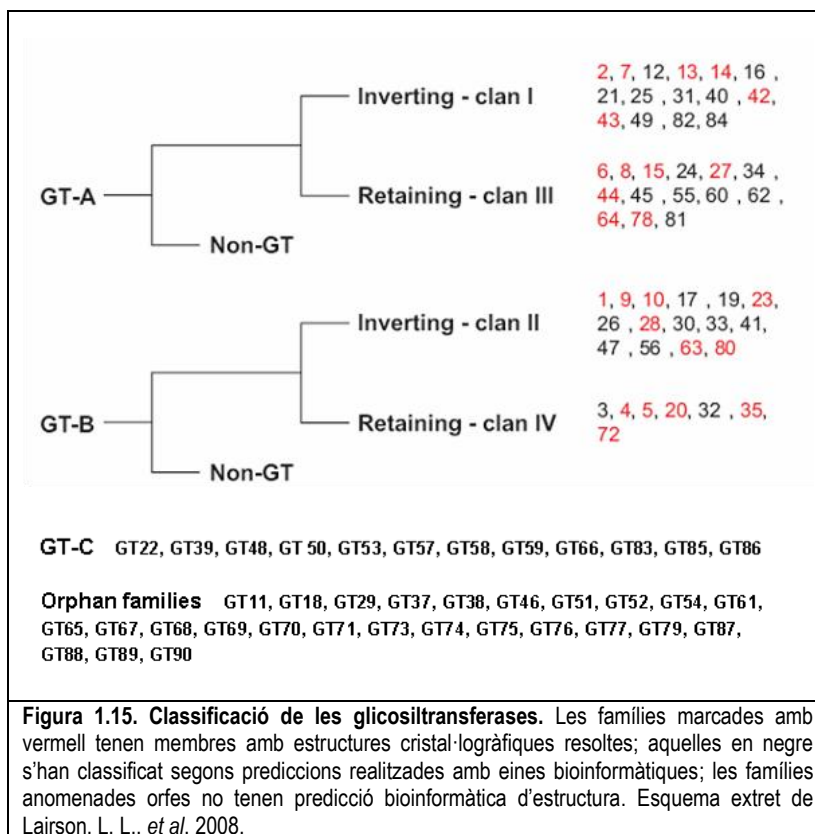
De totes les estructures cristal·logràfiques determinades fins al moment, únicament s'han observat dos tipus de plegament diferents per a les famílies de glicosiltransferases: el plegament GT-A i el plegament GT-B, representats ambdós per dues proteïnes model a la Figura 1.14. A més, per a les famílies sense cap representant amb l'estructura tridimensional determinada, s'han predit els mateixos i únics tipus de plegament, fet que implica l'evolució de totes les glicosiltransferases a partir d'un nombre petit de seqüències progenitores.



Com es pot visualitzar a la Figura 1.14, el plegament de tipus GT-A consisteix en una fulla plegada beta força oberta envoltada per hèlix α per les dues bandes, el qual provindria de la fusió de dos dominis de tipus Rossmann, típics de proteïnes que uneixen nucleòtids i que consisteixen en un domini on s'alternen hèlix α i fulles plegades beta ($\beta/\alpha/\beta$). Pel que fa al plegament de tipus GT-B, aquest es descriu com a dos dominis tipus Rossmann, molt més relaxats que en el cas del plegament GT-A, i que, segons la seva ubicació un davant de l'altre, generen una butxaca interior on es troba el centre actiu.

En els últims anys i en base a recerques realitzades sobre seqüències amb programes com BLAST, s'ha proposat un tercer tipus de plegament anomenat GT-C [Liu, J. i Mushegian, A., 2003]. Aquest estaria format per famílies de proteïnes hidrofòbiques integrals de membrana localitzades al reticle endoplasmàtic o a la membrana plasmàtica i posseïdores d'entre 8 i 13 hèlix transmembrana, amb un centre actiu situat en una regió consistent en un llarg loop. Ara bé, la primera estructura cristal·logràfica d'un membre d'aquest tipus de plegament, el domini C-terminal soluble de la oligosacariïltransferasa STT3 de *Pyrococcus furiosus* [Igura, M., et al, 2008], rebaixa la importància del plegament GT-C, ja que revela que la zona de la proteïna usada per a la seva classificació no inclou el domini catalític sinó únicament regions transmembrana. Aquest fet posa de manifest que totes les proteïnes a les quals se'ls adjudica el plegament GT-C podrien estar relacionades únicament a través de les esmentades hèlix transmembrana i no pels seus dominis catalítics.

Com s'ha comentat en el punt anterior, les glicosiltransferases actuen segons dos mecanismes de transferència de sucre diferents: inversió i retenció de configuració. Tots els membres d'una família de glicosiltransferases presenten el mateix mecanisme catalític, però no passa el mateix amb el tipus de plegament, ja que és possible trobar famílies amb mecanismes diferents i un plegament equivalent. Aquest fet ha propiciat l'establiment de clans, els quals engloben totes les famílies que posseeixen el mateix tipus de plegament i la mateixa activitat, tal com es presenta a la Figura 1.15.



1.5.3.1 GT-MG517, membre de la família GT2

La glicosiltransferasa en estudi en la present tesi es troba classificada a la família de glicosiltransferases GT2, tal com es comenta més endavant en diferents punts del treball.

Aquesta família és la que té un nombre més elevat de seqüències (pròximes a 23000 a finals de 2010) i més diversitat pel que fa a les activitats descrites fins al moment. Entre aquestes es troben l'activitat cel·lulosa sintasa, quitina sintasa, dolicol-fosfat β -D-manosiltransferasa, dolicol-fosfat β -glucosiltransferasa, N-acetilglucosaminiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, hialuran sintasa, quitina oligosacàrid sintasa, β -1,3-glucan sintasa, β -1,4-manan sintasa, β -manosilfosfodecaprenoilmanooligosacàrid α -1,6-manosiltransferasa i α -1,3-L-ramnosiltransferasa.

Pel que fa al seu plegament, la família GT2 es classifica dins del grup GT-A, tot i que disposa únicament de tres membres amb l'estructura cristal·logràfica determinada. Per aquells enzims pels quals s'ha estudiat la seva activitat, s'ha descrit un mecanisme que inverteix la configuració del sucre que és transferit, procediment que s'espera per totes les glicosiltransferases de la família i que s'ha corroborat per a GT-MG517 [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007].

La família GT2 es considera, juntament amb GT4, una de les més antigues, a partir de les quals podrien haver evolucionat la resta de glicosiltransferases, ja que són les dues úniques famílies que tenen entre els seus membres enzims d'*Archaea*.

1.6 Motivació del treball

Considerant tota la informació exposada en la present *Introducció* existeixen diversos motius que justifiquen un treball sobre una glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium*. El primer d'ells i potser el més rellevant és el relacionat amb la possibilitat d'aprofundir en la recerca d'una substància capaç d'eliminar les infeccions causades pel micoplasma, és a dir, l'opció d'emprar GT-MG517 com a diana terapèutica.

En l'actualitat les infeccions causades per *Mycoplasma genitalium* es tracten amb antibiòtics com l'azitromicina, la doxicilina, l'eritromicina o la levofloxacina. Ara bé, en molts casos es documenta l'incapacitat de l'antibiòtic per obtenir una eradicació total de la infecció i es fa necessari el subministrament d'un segon antibiòtic al pacient [Bradshaw C. S., *et al*, 2006].

La hipòtesi plantejada en el nostre grup passa per a un coneixement més profund de l'activitat de GT-MG517 i de la seva regulació en la membrana del microorganisme amb l'objectiu final de poder dissenyar inhibidors d'aquesta activitat, l'acció dels quals hauria d'anul·lar o afectar de forma irreversible la colonització de les cèl·lules d'un hoste per part de *Mycoplasma genitalium*. L'èxit de substàncies inhibidores de GT-MG517 podria estendre's a altres glicosiltransferases d'acció similar en altres micoplasmes, tot ampliant el seu espectre d'utilització.

Ara bé, si bé la hipòtesi de la diana terapèutica és la base de l'enfoc de la present tesi, cal no oblidar que es tracta precisament d'una hipòtesi i per tant, al llarg del desenvolupament del treball han aparegut altres motivacions i altres preguntes per contestar. Per què GT-MG517 genera un disacàrid amb un enllaç glicosídic $\beta(1\rightarrow6)$, més semblant a les glicosiltransferases de bacteris com *Staphylococcus* o *Bacillus* que no pas al seu teòricament parent més pròxim *Acholeplasma laidlawii*? Com es discuteix en el capítol 5, les glicosiltransferases bacterianes són seqüencials, mentre que en *A. laidlawii* existeixen dos enzims que produeixen respectivament el monoglicosil i el diglicosil diacilglicerol. Podria ser que al llarg de la seva evolució reductiva i en perdre la seva paret cel·lular d'organisme gram-positiu, *Mycoplasma genitalium* hagués mantingut l'activitat enzimàtica del que era el primer pas de la síntesi dels seus àcids lipoteicoics? Un fet així probablement implicaria que *Acholeplasma* no fos un parent tant pròxim a *Mycoplasma genitalium*, de forma que potser caldria plantejar-se quin és el paper real dels glicolípid i les membranes del patogen.

Un segon motiu per a l'estudi de GT-MG517 té un caràcter menys aplicat, però és igualment important, ja que per al disseny d'un bon inhibidor és necessari entendre totalment el funcionament de l'enzim del qual se'n pretén bloquejar l'activitat. Es tracta de l'aïllament de la proteïna i la seva caracterització cinètica, la qual també aportaria informació per a una millor comprensió de les glicosiltransferases en general i per a les de la família GT2 en particular, de la qual se'n posseeix poc coneixement si es considera el nombre de seqüències que en formen part. L'esmentada caracterització cinètica pot ajudar a comprendre com un enzim pot actuar de forma seqüencial tenint un primer substrat acceptor de caràcter hidrofòbic, el DAG, i un segon substrat de caràcter molt més hidrofílic, el MGlcDG, tret compartit de nou per *Mycoplasma genitalium* i bacteris gram positius.

Per últim, ja s'ha comentat l'interès creixent en els mercats pels biosurfactants. Un bon coneixement de l'activitat de GT-MG517 i un bon protocol per a la seva expressió recombinant i posterior aïllament permetria pensar en algun

tipus de bioreactor amb l'enzim purificat i ancorat en una matriu per tal de poder realitzar la síntesi en fase sòlida dels seus glicolípid, productes d'alt valor afegit per a la indústria.

Tot l'esmentat en els paràgrafs previs fa referència a l'estudi de GT-MG517. Ara bé, i com ja s'ha comentat en el punt 1.2 d'aquesta *Introducció*, el genoma de *Mycoplasma genitalium* conté dos altres gens anotats com a possibles glicosiltransferases, *mg025* i *mg060*. Tot i que la seva funció és encara desconeguda, la seva seqüència els relaciona amb enzims que actuen sobre sucres. Si l'objectiu del present treball és aportar llum sobre la síntesi de glicolípid en les membranes de *Mycoplasma genitalium*, no es pot ignorar el paper que podria correspondre a aquests altres dos gens, potser codificant proteïnes encarregades de la modificació dels glicolípid produïts per GT-MG517 per tal de regular de forma més precisa la seva funció en les membranes. Per tant, és necessari posseir més informació sobre si es tracta de gens essencials per al microorganisme o sobre en quins estadis del seu creixement es transcriuen, com a pas previ de cara a establir quina és la seva funció.

1.6.1 Objectius de la tesi

A partir de les motivacions presentades en l'apartat anterior, s'estableixen com a objectius de la present tesi els següents punts:

- Estudi de l'essencialitat dels gens que es troben anotats com a possibles glicosiltransferases en el genoma de *Mycoplasma genitalium*. En aquest punt s'hi inclou tant GT-MG517 com els gens *mg025* i *mg060* (Capítol 2).
- Estudi de la transcripció d'aquests mateixos gens durant el cultiu de *Mycoplasma genitalium in vitro* (Capítol 3).
- Millora de l'expressió i purificació de GT-MG517 per tal d'obtenir suficient proteïna per a la seva caracterització cinètica i amb una qualitat prou bona com per a intentar la seva cristal·lització (Capítol 4).
- Estudi cinètic de les dues reaccions de transglicosilació que l'enzim catalitza per tal d'obtenir els paràmetres cinètics de l'activitat monoglicosildialcilglicerol sintasa i de la diglicosildialcilglicerol sintasa (Capítol 5)
- Estudi de la influència de la zona C-terminal de l'enzim en la seva interacció a la membrana i en l'activitat glicosiltransferasa, ja que es coneix que la proteïna es troba associada a la membrana plasmàtica de *Mycoplasma genitalium* [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007] (Capítol 6).

DESCRIPCIÓ I DISCUSSIÓ DE RESULTATS

**PART I: Estudi dels tres gens
de *Mycoplasma genitalium*
anotats com a possibles
glicosiltransferases**

Part I

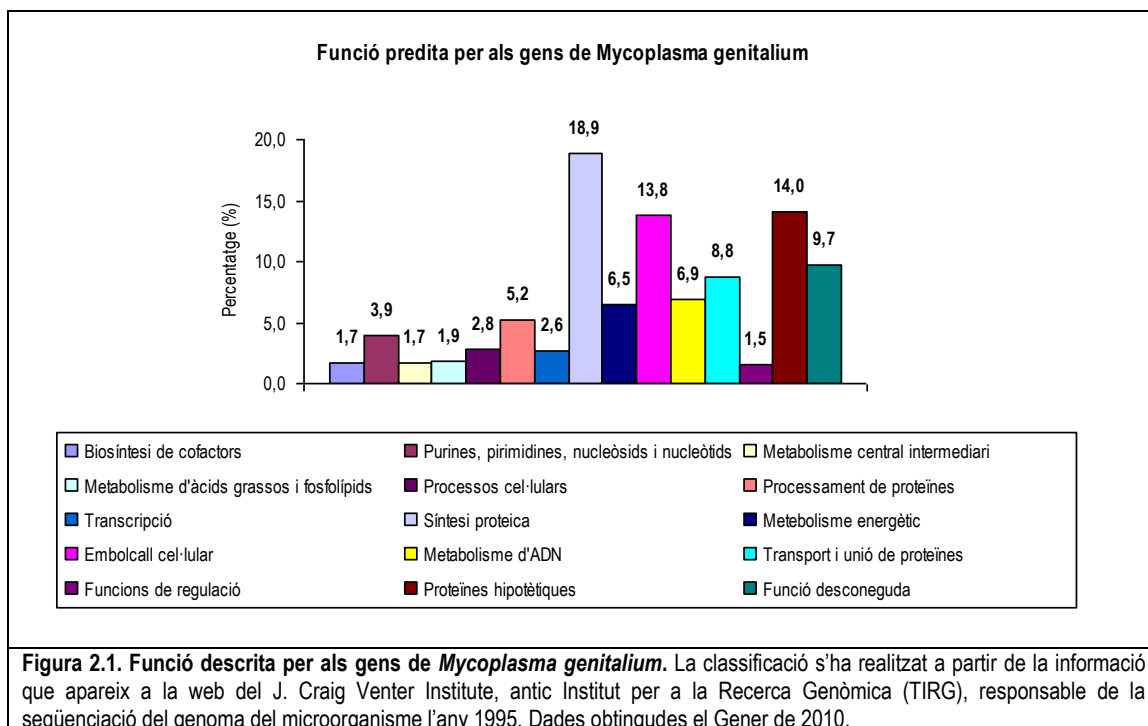
Capítol 2: Estudi de l'essencialitat de les
possibles glicosiltransferases de
Mycoplasma genitalium

2 Estudi de l'essencialitat de les possibles glicosiltransferases de *Mycoplasma genitalium*

2.1 Introducció

Mycoplasma genitalium va aïllar-se per primera vegada l'any 1981 de la uretra d'un pacient afectat per uretritis no gonocòccica [Tully, J. G., *et al*, 1981]. El seu reduït genoma, només 580 kb, va propiciar que fos un dels primers organismes en ser seqüenciat completament, en concret l'any 1995 [Fraser, C. M., *et al*, 1995]. Les seves aproximades 480 regions codificadores de proteïnes, si bé són suficients per permetre al micoplasma el seu desenvolupament parasitari i la colonització de les cèl·lules de l'hoste, es troben mancades dels enzims necessaris per a la síntesi d'aminoàcids, síntesi de cofactors, síntesi d'àcids grassos i síntesi dels precursors dels àcids nucleics [Razin, S., *et al*, 1998].

Com es pot veure en el gràfic de la Figura 2.1, la majoria de les proteïnes codificades en el genoma de *Mycoplasma genitalium* tenen funcions relacionades amb la síntesi i el processament d'altres proteïnes. Això indica que dins del procés de reducció genòmica sofert pel microorganisme al llarg de la seva evolució i que segurament és el responsable de la seva obligada vida parasitària [Fadiel, A., *et al*, 2007], s'ha conservat bàsicament la maquinària cel·lular relacionada amb la síntesi, degradació i transport de proteïnes, juntament amb tot el metabolisme de l'ADN.



No obstant ser l'organisme viu amb capacitat d'autoreplicació més petit que es coneix fins al moment i que es considera que posseeix un genoma altament aprofitat, el gràfic anterior demostra que encara constitueix un repte per a la comunitat científica, ja que posseeix gairebé un 25 % de proteïnes sense funció coneguda. A més, dins d'aquelles classificades en algun dels grups anteriors, un elevat percentatge no posseeix una funció demostrada experimentalment i es troba anotada únicament a partir de la similitud de la seva seqüència amb altres proteïnes conegudes.

2.1.1 Gens essencials dins del genoma de *Mycoplasma genitalium*

La mida del seu genoma ha propiciat la inclusió de *Mycoplasma genitalium* en molts dels estudis realitzats amb l'objectiu d'establir el nombre mínim de gens necessaris per a la vida.

En aquesta definició cal precisar que l'existència d'un conjunt mínim de gens és quelcom abstracte, ja que a la natura una cèl·lula mínima requeriria un entorn ideal, sense cap tipus de pressió selectiva i això és evident que no es produeix. En base a aquesta premissa, qualsevol genoma pot dividir-se en dos tipus de gens: aquells que proporcionen funcions cel·lulars bàsiques necessàries en qualsevol entorn imaginable i aquells que otorguen a l'organisme avantatges específics relacionats directament amb el nínxol que ocupa. Per tant, la definició d'un conjunt mínim de gens no té sentit si no va acompanyada de la descripció de l'entorn o medi de cultiu en el qual ha estat realitzada.

La primera aproximació teòrica per tal de definir el conjunt mínim de gens necessari per a la vida va realitzar-se l'any 1996 [Mushegian, A. R. i Koonin, E. V., 1996]. En aquell moment van comparar-se els dos únics genomes complets de què es disposava, el del *Mycoplasma genitalium* i el del bacteri *Haemophilus influenzae*, el qual s'havia aconseguit també l'any 1995 [Fleischmann, R. D., *et al*, 1995]. Aquests organismes havien evolucionat de forma divergent a partir d'un avantpassat comú feia 1500 milions d'anys. Mushegian i Koonin proposaren que els gens que s'haguessin mantingut en ambdós genomes després d'un període d'evolució tan llarg podien considerar-se com a essencials. A partir d'aquest raonament, es va definir un conjunt mínim format per 250 gens.

El problema de l'anàlisi computacional de genomes amb finalitats comparatives és que té tendència a subestimar el nombre de gens essencials, ja que no té en compte aquells gens que al llarg del procés evolutiu han sofert mutacions amb molta freqüència i, per tant, no són detectats com a gens ortòlegs tot i que codifiquen proteïnes amb la mateixa funció [Kobayashi, K., *et al*, 2003].

Una aproximació més experimental a la determinació del conjunt mínim de gens necessari per a la vida a partir del genoma de *Mycoplasma genitalium* ha estat la desenvolupada pel grup de J. Craig Venter a partir de la mutagènesi global del genoma mitjançant transposons [Hutchison III, C. A., *et al*, 1999; Glass, J. I., *et al*, 2006]. Aquests s'insereixen a l'atzar en la seqüència de nucleòtids i poden provocar la no transcripció d'un gen en funció de la posició de la inserció en la seqüència. Les cèl·lules viables després d'una mutagènesi per transposons se suposa que no contenen cap gen essencial afectat i, per tant, l'anàlisi del seu genoma proporciona informació d'aquells que són prescindibles. D'aquesta forma, l'estudi de l'any 1999 identificà entre 180 i 215 gens essencials en *Mycoplasma genitalium*, tot i que aquest nombre s'incrementà fins als 382 en la revisió de l'experiment realitzada l'any 2006.

Igual com ocorre amb l'anàlisi computacional, la mutagènesi per transposons pot generar resultats erronis; en aquest cas, però, sobreestimant el nombre de gens essencials, ja que una inserció pot generar un creixement tan lent de l'organisme, que es pot confondre amb l'abolició total del seu desenvolupament [Kobayashi, K., *et al*, 2003]. A més, és important assegurar l'anàlisi de colònies aïllades, ja que una població que provingui de diferents clons pot propiciar el subministrament creuat de metabòlits essencials que un d'ells no pugui produir i els altres sí i, d'aquesta forma, emascarar possibles funcions vitals per a l'organisme. Aquest fet és el que explica l'increment de gens

essencials en *Mycoplasma genitalium* entre l'estudi realitzat l'any 1999 i el de 2006, en el qual es tingué en compte aquesta última consideració.

En un intent de superar les mancances de la mutagènesi per transposons com a eina per a la determinació del conjunt mínim de gens necessaris per a un organisme, s'han desenvolupat altres tècniques, algunes basades en la mateixa mutagènesi per transposons però amb algunes modificacions i altres completament diferents. Així, per exemple, s'han determinat els gens essencials en *Haemophilus influenza* mitjançant una mutagènesi per transposons realitzada *in vitro* i analitzada per PCR i Southern blott [Reich, K., *et al*, 1999] o els de *Mycobacterium bovis*, un microorganisme relacionat amb la tuberculosi, emprant també mutagènesi per transposons, però combinant-la amb tecnologia d'hibridació amb *microarrays* [Sasseti, C., *et al*, 2001]. Aquest mateix mètode s'ha utilitzat per a la detecció dels gens essencials d'*Helicobacter pylori*, un patògen gàstric humà [Salama, N., *et al*, 2004]. Finalment, els gens essencials per a *Staphylococcus aureus* s'han establert mitjançant un mètode en el qual s'utilitza ARN complementari a un mARN per inhibir la corresponent expressió gènica [Forsyth, R., *et al*, 2002].

Inicialment existien dos transposons que podien ser emprats en micoplasmes, el Tn4001 aïllat d'*Staphylococcus aureus* [Lyon, B. R., *et al*, 1984] i el Tn916, aïllat d'*Enterococcus faecalis* [Franke, A. E. i Clewel, D. B., 1981], ambdós bacteris gram-positiu. Si bé Tn4001 fou usat amb èxit en diversos micoplasmes, com *Mycoplasma pneumoniae* [Hedreyda, C. T., *et al*, 1993], *Mycoplasma gallisepticum* [Cao, J., *et al*, 1994] o el propi *Mycoplasma genitalium* [Reddy, S. P., *et al*, 1996; Glass, J., *et al*, 2006] i per la seva mida pot considerar-se un vector de clonació de rutina en un laboratori, presenta problemes d'inestabilitat i dinamisme un cop ha tingut lloc la transposició, fet que sovint provoca problemes d'interpretació dels resultats obtinguts [Pich, O. Q., *et al*, 2006a]. Amb l'objectiu de solucionar aquest inconvenient, es construí un minitransposó basat en el Tn4001, el qual es provà amb èxit en *Mycoplasma gallisepticum* [Pour-El, I., *et al*, 2002].

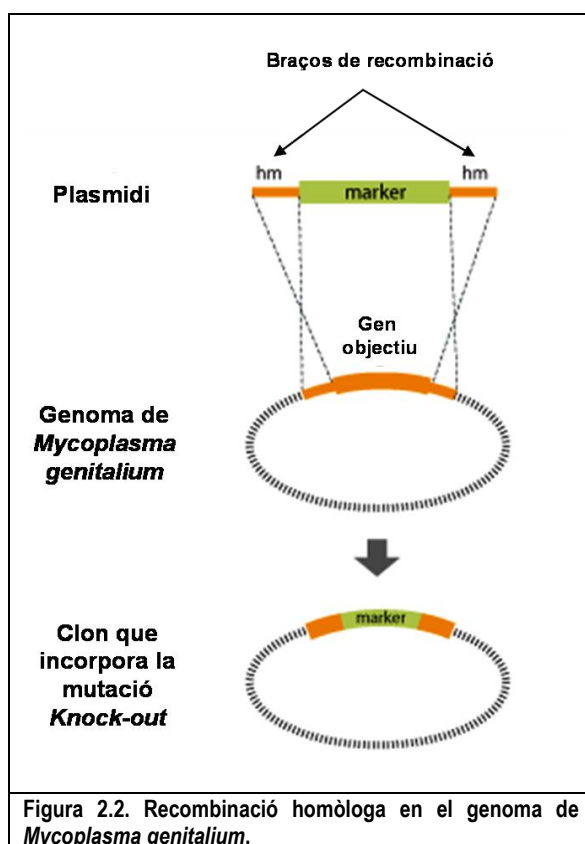
En eliminar un gen a partir de recombinació homòloga amb un transposó, aquesta acció pot incloure un marcador de selecció per tal de poder identificar aquells clons que han patit la modificació desitjada. El marcador més habitual en estudis sobre *Mycoplasma genitalium* és el gen *aac(6')-aph(2'')*, el qual confereix resistència a aminoglicòsids com la gentamicina i la kanamicina. Ara bé, en el grup de Biologia Molecular de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona s'ha desenvolupat un nou marcador de selecció basat en el gen *tetM*, el qual proporciona resistència a tetraciclina i que, combinat amb el minitransposó derivat de Tn4001, permet l'obtenció d'un nombre molt més elevat de transformants que quan s'empra el marcador que confereix resistència a gentamicina, a més de reduir considerablement el temps necessari per a la seva visualització en una placa de cultiu [Pich, O. Q., *et al*, 2006a]. L'esmentat marcador consisteix en la fusió entre el promotor d'un gen de *Mycoplasma genitalium*, *mg438*, i el gen de resistència a la tetraciclina *tetM*, l'expressió del qual queda sota el control del promotor.

Fent ús de l'esmentat mini-transposó, el qual rep el nom de MTnTetM438, el grup de l'IBB ha identificat com a essencials gens considerats prescindibles en l'estudi realitzat per Hutchinson III l'any 1999 [Pich, O. Q., *et al*, 2006a], si bé aquests resultats van ser rectificats en l'estudi millorat del grup de J. Craig Venter l'any 2006. També han identificat gens de *Mycoplasma genitalium* implicats en la motilitat del microorganisme [Pich, O. Q., *et al*, 2006b; Burgos, R., *et al*, 2008] o en la seva capacitat d'adhesió a altres cèl·lules [Pich, O. Q., *et al*, 2008].

2.1.2 Obtenció de *knock-outs* de *Mycoplasma genitalium* mitjançant recombinació homòloga

Totes les tècniques esmentades fins ara impliquen mutacions a l'atzar en l'ADN genòmic. Ara bé, també és possible generar clons d'un organisme en els quals s'hagi eliminat un únic gen per tal d'estudiar les implicacions que té l'absència del seu producte de transcripció en la seva viabilitat, morfologia, creixement i metabolisme.

Per a aquesta funció no s'utilitzen els transposons, ja que aquests s'insereixen a l'atzar en el genoma, sinó que es provoca una inserció dirigida a un punt concret, el gen a eliminar, mitjançant la recombinació homòloga de les seves seqüències adjacents amb les d'un plasmidi que també les conté, tal com es descriu esquemàticament en la Figura 2.2. Les esmentades seqüències s'anomenen braços de recombinació i el seu disseny és essencial per a l'èxit del procediment.



Com es pot veure en la Figura anterior, l'anàlisi de mutants defectius d'un gen en particular, és a dir, *knock-outs*, obtinguts per recombinació homòloga és possible perquè en l'esmentat procés se substitueix el gen en estudi per un marcador de selecció, el qual proporciona resistència a un antibiòtic concret únicament als clons que l'incorporen.

En el grup de Biologia Molecular de l'IBB s'ha emprat el marcador de selecció que inclou el promotor del gen *mg438* i el gen de resistència a la tetraciclina *tetM*, comentat anteriorment, en clons defectius per a diversos gens. En concret, s'ha estudiat en profunditat la funció de MG312 com a proteïna relacionada amb la motilitat de *Mycoplasma genitalium* [Burgos, R., *et al*, 2007] i la de MG191 i MG192 com a proteïnes relacionades amb la seva capacitat de citadherència [Burgos, R., *et al*, 2006], ambdós factors d'elevada importància en la patogenicitat del microorganisme.

2.1.3 Gens *mg025*, *mg060* i *mg517*: possibles glicosiltransferases de *Mycoplasma genitalium*

El genoma de *Mycoplasma genitalium* conté únicament tres gens anotats com a glicosiltransferases, els quals són respectivament *mg025*, *mg060* i *mg517*. D'aquests tres, només es coneix la funció de *mg517*, la qual s'ha establert al laboratori en un treball anterior a la present tesi [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007], com ja s'ha explicat en la *Introducció*. Tanmateix, per als altres dos gens es desconeix totalment la seva funció, la qual podria tenir relació amb la síntesi de glicolípid, tot complementant l'activitat de GT-MG517, o ser categòricament diferent.

Pel que fa a la seva essencialitat, en cap dels estudis realitzats per grup de J. Craig Venter es detecten insercions en els gens *mg060* i *mg517*, considerant-los per tant imprescindibles per al creixement del bacteri. El cas de *mg025* és diferent, ja que en l'estudi de 1999 s'estableix com a no essencial, mentre en la revisió de 2006 no es repeteix el resultat, sinó que s'inclou el gen dins del conjunt de gens essencials, ja que no s'aïlla cap clon amb una inserció en la seva posició.

Ja que el primer pas per a l'establiment de la funció de *mg025* i *mg060* és conèixer si aquesta és essencial per al desenvolupament de *Mycoplasma genitalium*, es decideix obtenir els seus corresponents *knock-outs* a partir de recombinació homòloga, seguint la metodologia desenvolupada i provada amb èxit pel grup de Biologia Molecular de l'IBB. El mateix procediment es realitza també per a *mg517*, tot i que la funció de GT-MG517 es preveu com a totalment essencial per al micoplasma, ja que els glicolípid que sintetitza l'enzim tenen un paper fonamental en les propietats físiques de la seva membrana, tal com s'ha comentat anteriorment.

2.2 Disseny i construcció dels plasmidis suïcides que permetin generar els *knock-outs* dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517* de *M. genitalium*

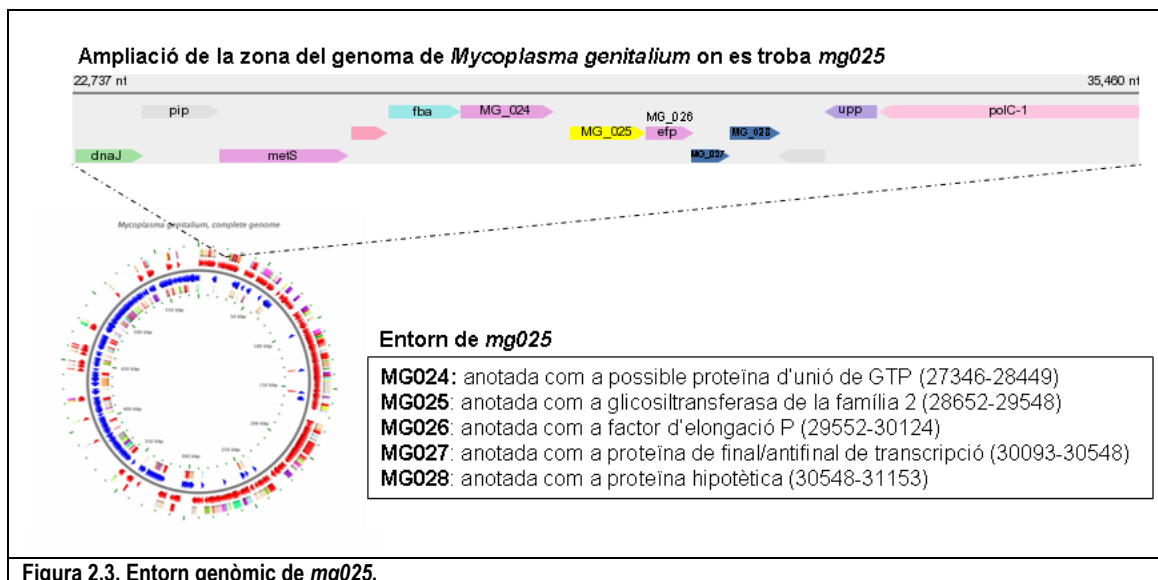
El procediment a partir del qual s'obtenen els *knock-outs* per als tres gens de *Mycoplasma genitalium* en estudi inclou bàsicament tres etapes.

Inicialment és necessari l'estudi de l'entorn genòmic de cada gen, per tal d'establir la possibilitat que es tracti de l'inici d'un operó i, per tant, la seva disrupció comporti afectacions sobre l'expressió dels altres gens, o simplement que contingui en la seva seqüència elements de regulació de l'expressió, com promotors o terminadors, dels gens situats abans o després en el genoma. Un cop establerta la zona que s'eliminarà del gen en estudi i la longitud dels fragments que s'usaran per a la recombinació homòloga, cal construir el plasmidi suïcida que s'empra per a introduir les seqüències recombinants i el marcador de selecció dins la cèl·lula del micoplasma, mitjançant transformació d'aquesta. Finalment cal avaluar els resultats a partir de l'anàlisi de l'ADN genòmic dels clons obtinguts després de l'esmentada transformació. En cas que hagi tingut lloc la recombinació homòloga i el mutant aïllat sigui defectiu en el gen desitjat, aquest fet ja denota la no essencialitat d'aquest. Tanmateix és possible que el mutant no s'hagi generat per recombinació homòloga doble, sinó que aquesta hagi estat simple, únicament per un dels dos braços de recombinació. Aquesta possibilitat pot implicar que el clon aïllat continuï tenint el gen que es pretenia eliminar, motiu pel qual és necessari un anàlisi per Southern blott que faciliti una visió clara dels resultats generats en l'experiment.

2.2.1 Estudi de l'entorn dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517*

2.2.1.1 Gen *mg025*

A la Figura 2.3 es mostra una ampliació de la zona del genoma de *Mycoplasma genitalium* pròxima a *mg025*. En ella s'enumeren els gens que es troben al voltant de *mg025*, juntament amb una descripció de les funcions que se'ls hi assignen a partir de la similitud de la seva seqüència amb altres de gens de funció coneguda.

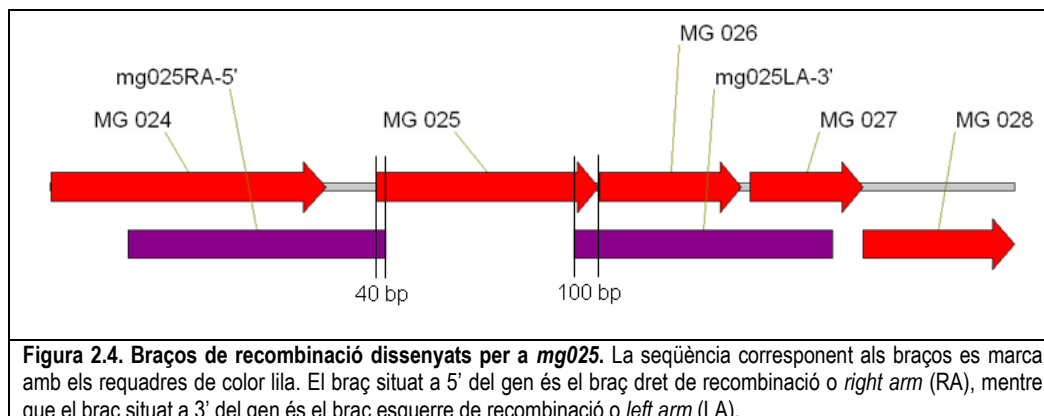


Tal com s'estructuren els gens al voltant de *mg025*, aquest gen podria tractar-se de l'inici d'un operó, ja que el final del gen *mg024* es troba a unes 200 bases del seu codó d'inici i tots els gens que segueixen fins a *mg028* es troben en el mateix sentit dins de la seqüència i amb molt poques bases que els separen entre ells. En concret, l'inici de *mg026* es localitza únicament a 3 bases del codó de parada de *mg025*, *mg027* comença a 30 bases del final de *mg026* i per acabar, *mg028* té el codó d'inici immediatament després del final de *mg027*.

Si bé les proteïnes per les quals codifiquen els membres de l'hipotètic operó no estarien relacionades pel que fa a la seva funció, la manca de sistemes de regulació de la transcripció en *Mycoplasma genitalium* provoca que aquest fet no sigui estrany, tal com s'ha descrit per al clúster *ftsZ* relacionat amb la divisió cel·lular conservat tant en *Mycoplasma genitalium* com en *Mycoplasma pneumoniae* [Benders, G. A., et al, 2005].

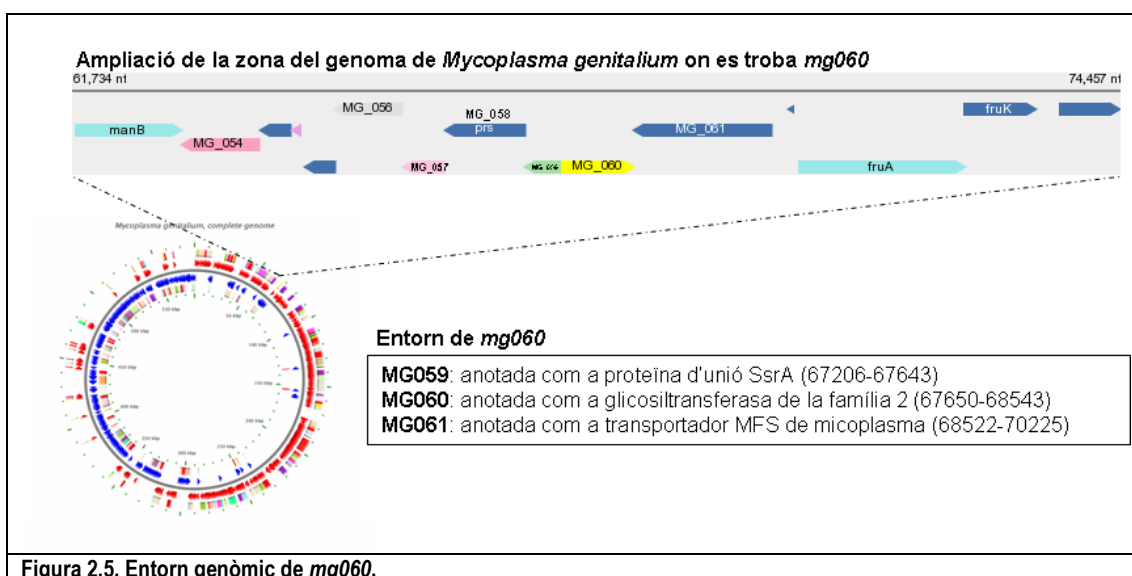
Així doncs, si bé en el disseny del *knock-out* es podria pensar en l'eliminació completa del gen *mg025* pel seu extrem 5', ja que tots els elements de regulació de la transcripció es trobarien a l'exterior del gen, entre les bases que el separen de *mg024*, es decideix conservar 40 bases del seu inici per motius relacionats amb el disseny dels encebadors, els quals es comentaran a continuació. Pel que fa a l'extrem 3' de *mg025*, el *knock-out* es dissenya de manera que se'n conserven 100 bases. En conseqüència, al mutant defectiu en *mg025* resultant del procés se li haurà eliminat un 84 % de la seqüència codificant de l'esmentat gen, en cas que sigui viable i pugui aïllar-se, fet que assegura que no expressarà MG025. Cal notar que dins d'aquest percentatge s'inclou el domini d'unió per nucleòtid que presenta la proteïna i que la classifica com a glicosiltransferasa de la família GT2 del CAZy, domini que es descriu com l'hipotètic centre actiu de l'enzim.

A la Figura 2.4 es presenta esquemàticament la localització dins de la seqüència de l'entorn de *mg025* dels braços de recombinació dissenyats, ambdós d'aproximadament 1000 bases.



2.2.1.2 Gen *mg060*

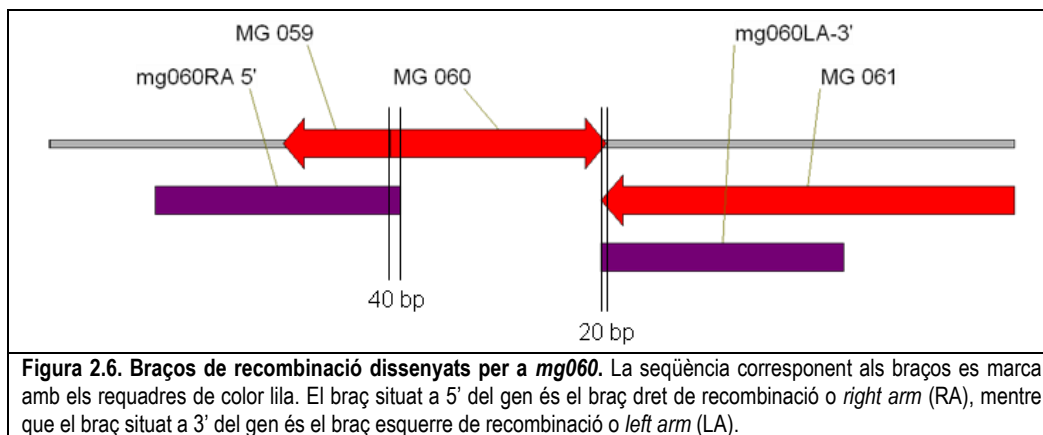
En el cas de *mg060*, la seva posició en el genoma fa impossible que es tracti de l'inici d'un operó, ja que tant el gen que el precedeix com el següent es troben orientats de forma oposada a ell, tal com pot observar-se en la Figura 2.5. No obstant, no és recomanable l'eliminació completa de l'extrem 5' del gen, ja que probablement inclogui elements de regulació de l'expressió per als gens *mg059*, *mg058* i següents, la disposició dels quals sí que fa pensar en un operó. Cal notar que únicament existeixen 6 bases entre l'inici dels dos gens, *mg059* i *mg060*. Per aquest motiu es dissenya un braç de recombinació que permet conservar 40 bases de *mg060* i no modificar, per exemple, un possible promotor per a *mg059* que es trobi en la seva seqüència.



Pel que fa a l'extrem 3' de *mg060*, no es creu òptima l'eliminació de tota la seqüència del gen, ja que en ella podria trobar-se un terminador per a la parada de la transcripció de *mg061*, donat l'existència d'únicament 16 bases entre ambdós codons de parada. Per tant, en el disseny del braç de recombinació d'aquest extrem, es conserven 20 bases de *mg060*, les quals sumades a les que es conserven en el braç de recombinació de l'extrem 5', suposen

l'eliminació en el *knock-out* d'un 93 % de la seqüència de la proteïna codificada per *mg060*, valor que assegura que un mutant defectiu en l'esmentat gen no expressarà l'enzim, en cas que sigui viable el seu creixement.

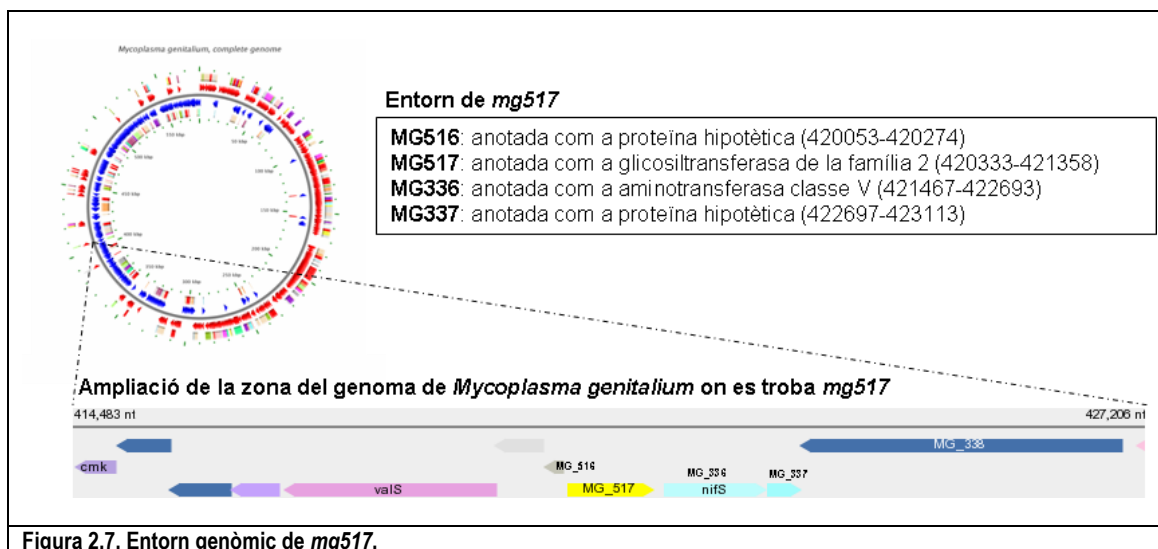
A la Figura 2.6 es presenta un esquema de la localització dels braços de recombinació dissenyats per al *knock-out* del gen *mg060*.



2.2.1.3 Gen *mg517*

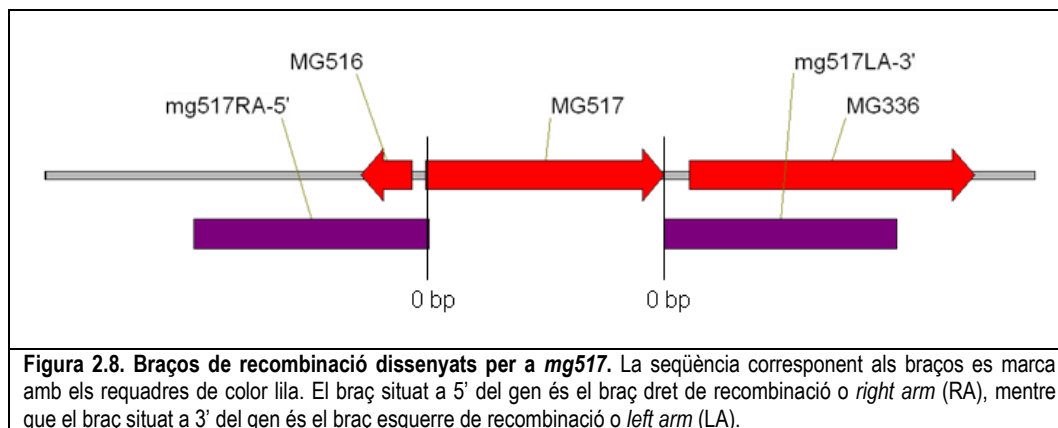
Finalment, s'analitza l'entorn del gen *mg517* per tal d'establir el disseny més adequat per als braços de recombinació necessaris per a la preparació del corresponent *knock-out*. A la Figura 2.7 es presenta una ampliació de la zona del genoma de *Mycoplasma genitalium* on es troba *mg517*.

Pel que fa al seu extrem 5', cal dir que es troba separat del codó de parada de *mg516* per gairebé 60 bases. Es considera que qualsevol element de regulació de la transcripció, ja sigui un terminador per a aquest gen o un promotor per a *mg517*, formarà part de les esmentades 60 bases, fet que fa possible l'eliminació completa de l'extrem 5' del gen.



Entre el codó de parada de *mg517* i l'inici del següent gen, *mg336*, existeixen quelcom més de 100 bases. Aquesta distància implica, d'una banda, que *mg517* no forma part d'un hipotètic operó en el qual s'hi inclourien també *mg336* i *mg337*, i de l'altra, que el promotor per a *mg336* es troba en aquest espai intergènic. Per tant, en dissenyar el braç de recombinació per a l'extrem 3' de *mg517* és possible eliminar la totalitat de la seva seqüència. En conseqüència, el *knock-out* dissenyat per a *mg517* elimina la totalitat de la seqüència del gen, fet que implica que un possible mutant no expressaria amb tota seguretat la proteïna GT-MG517.

A la Figura 2.8 es presenta el disseny esquemàtic dels braços de recombinació per a *mg517*.



Un cop es disposa d'un disseny racionalitzat dels braços de recombinació per a l'obtenció dels *knock-outs* dels tres gens de *Mycoplasma genitalium*, és necessària la seva obtenció a partir del genoma del microorganisme per PCR i la seva inclusió en un plasmidi que contingui també el marcador de selecció per a la tetraciclina i el promotor que permeti l'expressió del gen contra l'antibiòtic. Amb aquest plasmidi es transformaran cèl·lules del micoplasma, en les quals es pretén tinguí lloc la recombinació homòloga i l'eliminació dels gens en estudi.

2.2.2 Obtenció dels braços de recombinació pels gens *mg025*, *mg060* i *mg517*

Els plasmidis que cal construir per a l'obtenció dels *knock-outs* es troben constituïts per quatre parts diferents. Dues d'elles són comuns en tots els casos: el gen *tetM* de resistència a la tetraciclina i el seu promotor i el fragment de vector en el qual s'insereixen tots els altres fragments d'ADN, el qual deriva com s'explica més endavant del vector de clonació pUC18. Aquelles parts diferents per a cada *knock-out* són els braços de recombinació, els quals són equivalents a les zones prèvies i posteriors als gens en estudi, com s'ha vist en l'apartat anterior.

2.2.2.1 Disseny dels encebadors per a la reacció de PCR

Cadascun dels esmentats braços s'obté mitjançant la seva amplificació per PCR, usant l'ADN genòmic de *Mycoplasma genitalium* com a motlle de la reacció. En el procés s'aprofita per a introduir les dianes dels enzims de restricció que permetran la posterior lligació dels braços amb la resta de fragments per a l'obtenció del plasmidi final.

A la Taula 2.1 es presenten els encebadors dissenyats amb tal propòsit, amb algunes de les seves característiques més rellevants, les quals són la seva longitud, temperatura de fusió, l'energia d'hibridació amb la zona corresponent

del motlle i l'energia de formació del dímer més probable. L'encebador es dissenya per tal que aquest últim valor sigui el més baix possible en relació a l'energia d'hibridació. D'aquesta manera s'evita la disminució en el rendiment de la reacció de PCR deguda a la pèrdua de molècules d'encebador que no es troben hibridades amb el motlle sinó formant dímers improductius entre elles mateixes.

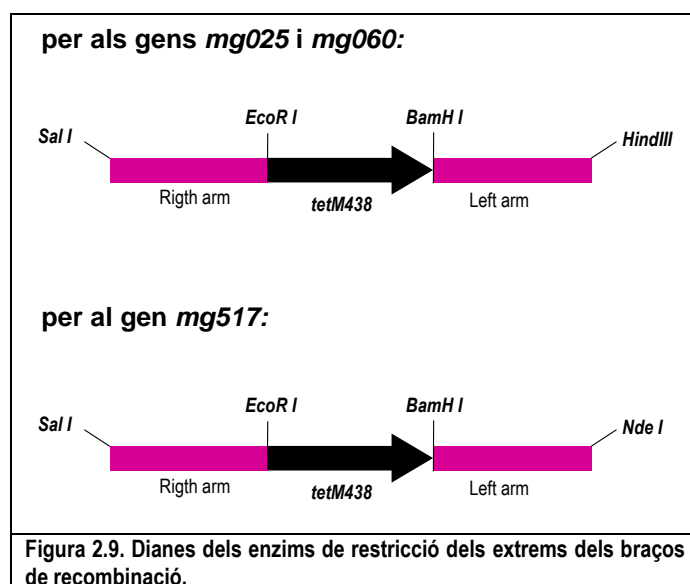
Taula 2.1. Encebadors dissenyats per a l'obtenció dels braços de recombinació per als knock-outs.

Encebador	Característiques			
	Longitud total (bp)	T _{fusió} (°C)	dG _{hib} (kcal/mol)	dG _{hib} dímer (kcal/mol)
mg025RA5' 5'- TAATTTGTGTCGACGTAAGATGTTTTTC-3' <i>Sal I</i>	26	55	-41.2	-4.4
mg025RA3' 5'- TGACAACGAATTCATGTTGGAATT -3' <i>EcoR I</i>	24	55.1	-37.9	-3.5
mg025LA5' 5'- TACTGAAGGATCCCCATAAACCAGCTT-3' <i>Bam H I</i>	27	60.3	-45.8	-5.8
mg025LA3' 5'- TCTTTTGAAGCTTAAGTGCACATAAAACA-3' <i>Hind III</i>	29	58	-45.5	-5.2
mg060RA5' 5'- TATTAACGTCGACCTTTTAACCCC-3' <i>Sal I</i>	24	54.7	-40.6	-4.4
mg060RA3' 5'- TTTCAGAATTCGATGCACAATTGTA -3' <i>EcoR I</i>	25	55.5	-39.2	-7.0
mg060LA5' 5'- TGATTGGATCCTTATTTCACAGTTCTG -3' <i>Bam H I</i>	28	57.9	-43.3	-5.8
mg060LA3' 5'- TATCTAAAAGCTTCCTTTGGGGTTTT-3' <i>Hind III</i>	26	56.3	-44.2	-5.2
mg517RA5' 5'- TTATGAAGTCGACCTGTTAGATTGG-3' <i>Sal I</i>	26	54.9	-40.3	-4.4
mg517RA3' 5'- TGATTATGAATTCGAAGTTTATCCATT-3' <i>EcoR I</i>	27	53.7	-41.1	-3.5
mg517LA5' 5'- TCAGATGGATCCTTAAGTTCTCTTTAAA -3' <i>Bam H I</i>	28	54.7	-42.3	-5.8
mg517LA3' 5'- TTTCACCATATGTAAATCTTTTGC -3' <i>Nde I</i>	26	53.1	-40.3	-2.8

Cal observar que les temperatures de fusió dels encebadors oscil·len entre 53 i 60 °C. El valor d'aquest paràmetre es troba determinat pel percentatge de G+C de l'encebador. Una característica del genoma de *Mycoplasma genitalium* és el seu baix contingut en les esmentades bases, especialment a les zones intergèniques [Razin, S., et al, 1998]. Com s'ha comentat en el disseny dels braços de recombinació pel gen *mg025*, ha estat necessari

conservar 40 bases de l'extrem 5' del gen perquè, donat el baix contingut en G+C de la zona prèvia del genoma, no era factible el disseny d'uns encebadors amb una temperatura de fusió suficientment elevada.

D'altra banda, es pot comprovar com tots els encebadors incorporen a la seva seqüència les bases corresponents a la diana d'un enzim de restricció. Aquesta ha de servir per a facilitar la lligació dels braços, per un extrem amb el gen de la resistència a la tetraciclina i per l'altre, amb el vector pUC18 que s'usarà per a la transformació. El gen *tetM* més el seu promotor, els quals han estat proporcionats pel laboratori de Biologia Molecular de l'IBB, es troben entre les dianes *EcoR I* i *BamH I*, tal com es pot veure en la Figura 2.9. Per aquest motiu, els encebadors corresponents a l'extrem 3' del braç dret (RA) i a l'extrem 5' del braç esquerre (LA) de cada *knock-out* presenten les seqüències corresponents a aquests enzims de restricció.



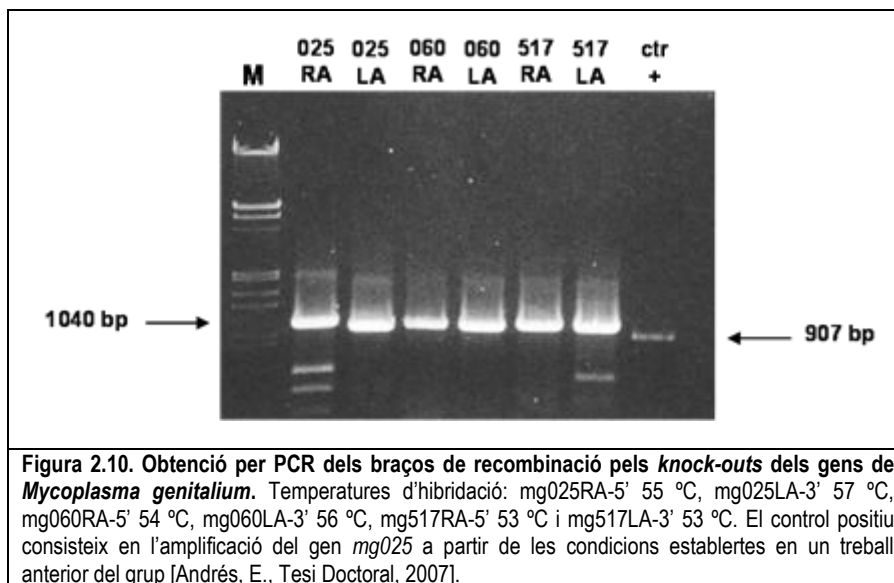
Pel que fa a les dianes que han de facilitar la lligació dels braços amb el fragment corresponent del vector pUC18, no són iguals per als tres *knock-outs*. L'extrem 5' del RA conté en tots els casos la diana *Sal I*, però l'extrem 3' del LA conté la diana *Hind III* per als gens *mg025* i *mg060*, mentre que és la diana *Nde I* la que incorporen els encebadors del gen *mg517*. El motiu d'aquest canvi necessari és la presència de la diana *Hind III* dins de la seqüència del braç de recombinació, fet que provocaria la seva digestió en el moment de la digestió de la diana.

2.2.2.2 Amplificació dels braços de recombinació a partir d'ADN genòmic de *Mycoplasma genitalium*

Cadascun dels braços de recombinació s'obté mitjançant la seva amplificació amb una reacció de PCR, la qual utilitza els encebadors anteriorment presentats i ADN genòmic de *Mycoplasma genitalium*.

Per tal d'obtenir l'esmentat ADN genòmic, s'utilitza un protocol ja desenvolupat anteriorment en el grup [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007] i descrit en el punt 8.1.2 de la *Part Experimental*. Pel que fa a les diferents reaccions de PCR, cal esmentar que, ja que el motlle és ADN genòmic, les concentracions de Mg^{2+} i dNTPs són més elevades que el que s'estableix en un protocol estàndard. També pel mateix motiu, abans d'iniciar els diferents cicles d'amplificació, es procedeix a relaxar l'estructura secundària de l'ADN genòmic mitjançant un *hot start*, per tal que els encebadors

puguin hibridar de forma més fàcil a les corresponents zones complementàries. Aquest protocol es descriu en el punt 8.1.3 de la *Part Experimental*.



El gel de la Figura 2.10 permet la visualització de l'amplificació obtinguda per a cada braç de recombinació. La mida dels fragments és en tots els casos l'esperada, entre 1040 i 1000 bp, excepte en el cas del control positiu, en el qual és de 907 bp. Per a les mostres corresponents al RA del knock-out del gen *mg025* i al LA del knock-out del gen *mg517* s'aprecien bandes de pes molecular inferior, corresponents a hibridacions inespecífiques dels encebadors en altres punts de la seqüència del motlle. Tanmateix, la recuperació dels fragments amplificats mitjançant la seva extracció del gel d'agarosa desestima la possibilitat de contaminació d'aquests amb fragments d'altres mides.

2.2.2.3 Digestió dels braços de recombinació

Tal com s'ha indicat en el disseny dels encebadors per a l'obtenció dels braços de recombinació, cadascun d'ells incorpora als seus extrems dues dianes de restricció diferents. La seva digestió amb els enzims de restricció corresponents pot fer-se en una única reacció, si les activitats enzimàtiques poden desenvolupar-se en unes condicions consens per als dos enzims, o requerir una digestió seqüencial, amb un pas intermedi de purificació de l'ADN mitjançant la seva extracció d'un gel, sempre que els enzims no posseeixin unes condicions de reacció compatibles. A la Taula 2.2 es presenten les condicions de digestió per a cada braç de recombinació, derivades de la compatibilitat de les parelles d'enzims de restricció.

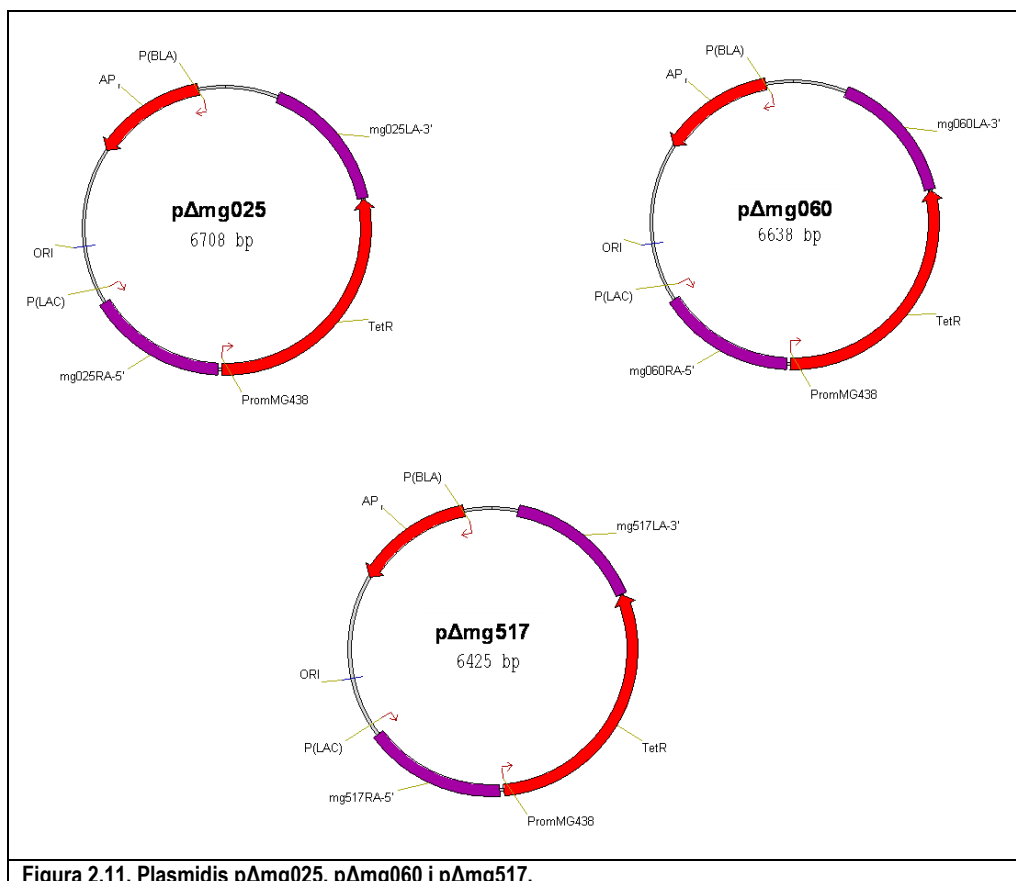
Taula 2.2. Condicions de digestió pels braços de recombinació

Braç	Enzims	Condicions de digestió
mg025RA	<i>Sal I</i> i <i>EcoR I</i>	Digestió doble
mg025LA	<i>BamH I</i> i <i>Hind III</i>	Digestió seqüencial
mg060RA	<i>Sal I</i> i <i>EcoR I</i>	Digestió doble
mg060LA	<i>BamH I</i> i <i>Hind III</i>	Digestió seqüencial
mg517RA	<i>Sal I</i> i <i>EcoR I</i>	Digestió doble
mg517LA	<i>BamH I</i> i <i>Nde I</i>	Digestió doble

El procediment seguit per a dur a terme les esmentades digestions es detalla al punt 8.1.4.1 de la *Part Experimental*.

2.2.3 Obtenció dels plasmidis pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517

Un cop es disposa dels braços de recombinació per a cada gen, la construcció dels plasmidis suïcides que permetran la transformació de *Mycoplasma genitalium* i l'obtenció dels corresponents *knock-outs* requereix només l'ensamblatge de cadascuna de les seves parts, és a dir, els propis braços, el marcador de selecció i el fragment del vector pUC18 per arribar als tres vectors que es presenten en la Figura 2.11.

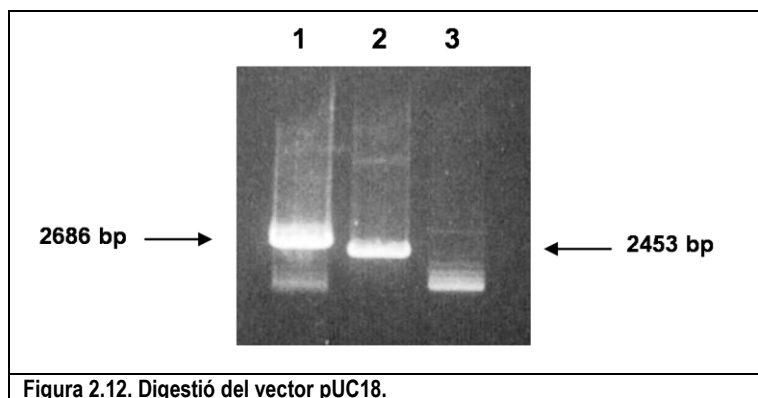


2.2.3.1 Digestió del vector pUC18

El fragment del vector pUC18 s'obté per digestió d'aquest amb els enzims de restricció corresponents en cada cas. Cal recordar que són necessaris dos fragments diferents, ja que en un cas la unió amb els braços té lloc a partir de les dianes *Sal I* i *Hind III* i en un altre, a partir de *Sal I* i *Nde I*.

El fragment derivat de la digestió amb *Sal I* i *Hind III* requereix una digestió seqüencial, mentre que la que es realitza amb *Sal I* i *Nde I* pot fer-se amb els dos enzims a la vegada. Les condicions aplicades en cada cas es recullen en el punt 8.1.4.2. de la *Part Experimental*.

A la Figura 2.12 es mostren els fragments del vector pUC18 després de la digestió amb *Sal I* (carril 1) i després de la digestió doble amb *Sal I* i *Nde I* (carril 2). Com a control, s'inclou el vector sense digerir (carril 3), el qual permet apreciar que en el primer cas, la digestió no ha estat completa.



2.2.3.2 Digestió del gen *tetM438*

La última part que resta per a la lligació final de tots els fragments que generaran els plasmidis suïcides pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517 és el gen de la resistència a la tetraciclina més el promotor de *Mycoplasma genitalium* corresponent al gen *mg438*. Com ja s'ha comentat, el conjunt ha estat proporcionat pel laboratori de Biologia Molecular de l'IBB en forma d'una construcció on els dos elements es troben col·locats entre les dianes *EcoR* i *BamH* I.

Per tant, es procedeix a la digestió del vector amb els corresponents enzims en una única reacció, tal com es descriu en el punt 8.1.4.3 de la *Part Experimental* i a la seva recuperació mitjançant l'extracció d'un gel d'agarosa.

2.2.3.3 Lligació dels fragments i anàlisi de transformants

Per tal d'unir tots els fragments que han de generar els plasmidis pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517 es decideix realitzar una reacció de lligació amb tots ells a la vegada, és a dir, amb els dos braços de recombinació corresponents, el gen de resistència *tetM438* i el fragment del vector pUC18. Això implica que la lligasa ha d'unir de forma correcta quatre fragments diferents d'ADN en una sola reacció.

Tal com es descriu en els protocols de lligació habituals, s'utilitza una relació molar 3:1 entre insert i vector, considerant com a inserts els dos braços de recombinació i el gen de resistència a l'antibiòtic. En el punt 8.1.5. de la *Part Experimental* es detalla el procediment seguit. Com a controls de lligació s'utilitzen reaccions on únicament s'inclou el vector pUC18 digerit, en les seves dues possibilitats (*Sal* I - *Hind* III i *Sal* I - *Nde* I). Teòricament, per a una població correctament digerida de vector, no s'haurien d'obtenir colònies després d'una transformació, ja que aquestes representarien la seva recircularització. Tanmateix, a la Taula 2.3 s'observa com en ambdós controls s'obtenen colònies, i en un nombre molt semblant o superior al que s'obté per a les reaccions de lligació completes. Aquest fet indica l'existència de dues poblacions en les mostres de vector pUC18 digerit, una de correctament tallada on manca una part del plasmidi original i una segona en la qual únicament s'ha obert aquest plasmidi i s'ha linealitzat.

De totes les colònies obtingudes per a cada *knock-out*, únicament se n'analitzen algunes amb la finalitat d'establir quines d'elles contenen la construcció correcta, tal com també s'indica a la Taula 2.3.

Taula 2.3. Colònies obtingudes després de la lligació múltiple.		
Mostra	Número de colònies	Número de colònies analitzades
pΔmg025	> 100	8
pΔmg060	2	2
pΔmg517	30	8
Control de recircularització (<i>Sal I</i> - <i>Hind III</i>)	20	-
Control de recircularització (<i>Sal I</i> - <i>Nde I</i>)	11	-
Control positiu	Tota la placa plena de colònies	
		-

Després d'aïllar els plasmidis corresponents a les colònies escollides, el primer dels controls consisteix en una anàlisi de restricció de l'ADN amb dues parelles d'enzims: *EcoR I* i *Sal I* per una banda i *BamH I* i *Nde I* per l'altra, tal com es descriu en el punt 8.1.6.1 de la *Part Experimental*.

A la Taula 2.4 es recullen les longituds dels fragments que cadascuna de les digestions genera, tant en el cas que es tracti de la construcció correcta del plasmidi, com de la recircularització del vector pUC18.

Taula 2.4. Fragments teòrics generats per les digestions dobles en l'anàlisi de restricció.		
	<i>EcoR I</i> i <i>Sal I</i>	<i>BamH I</i> i <i>Nde I</i>
pΔmg025	5629 bp, 1046 bp, 33 bp	2441 bp, 1690 bp, 1316 bp, 1261 bp
pΔmg060	5589 bp, 1016 bp, 33 bp	2441 bp, 1690 bp, 1286 bp, 869 bp, 352 bp
pΔmg517	5373 bp, 1019 bp, 33 bp	2441 bp, 1690 bp, 1289 bp, 1005 bp
pUC18 recircularitzat	2653 bp, 33 bp	2441 bp, 245 bp

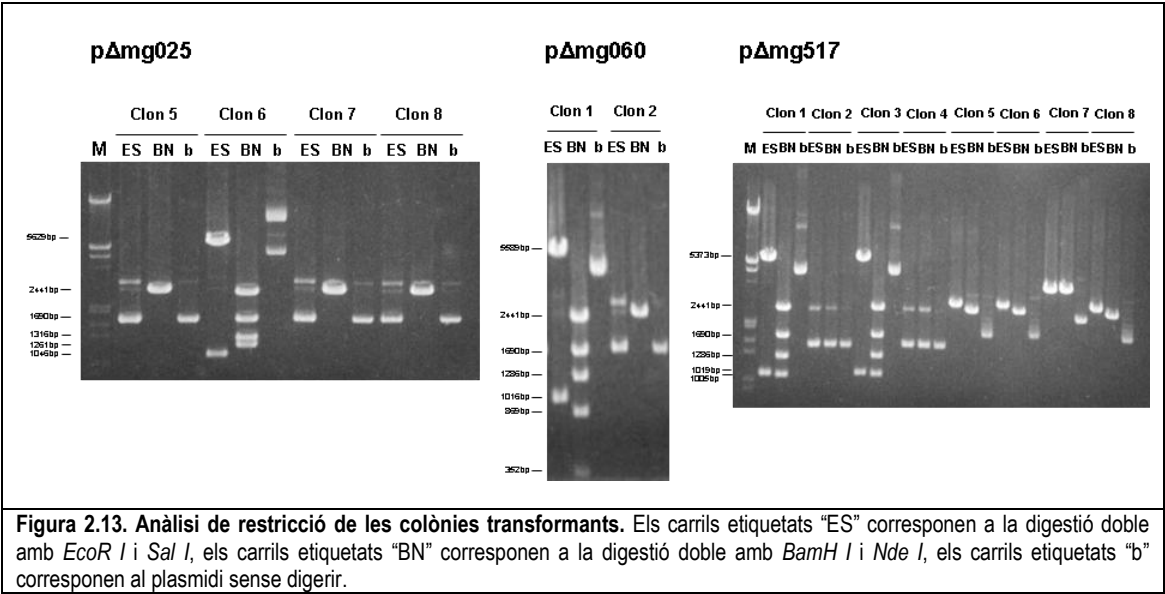


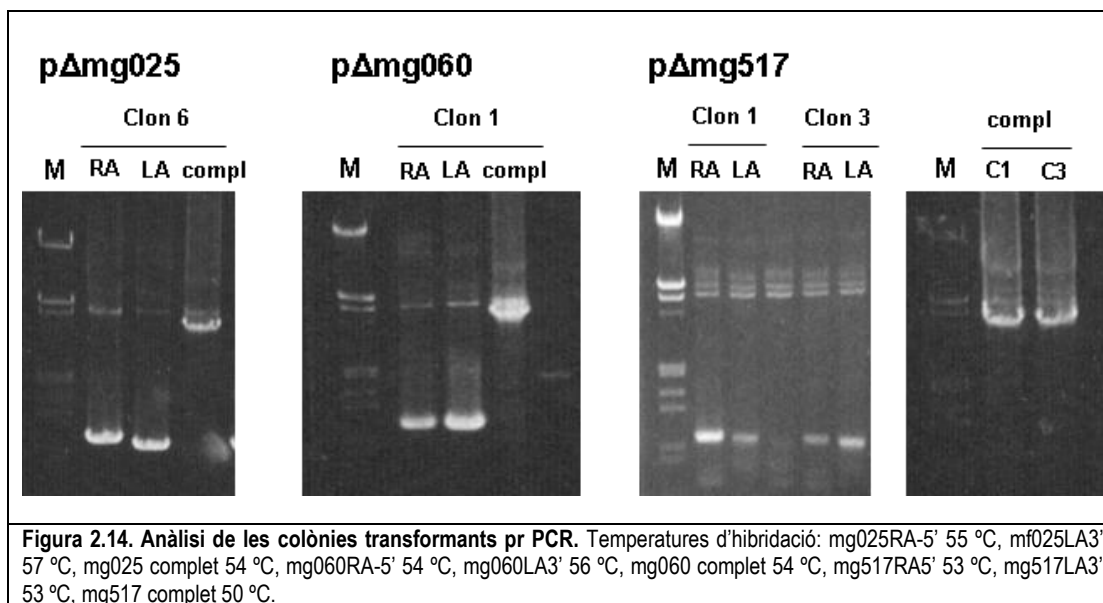
Figura 2.13. Anàlisi de restricció de les colònies transformants. Els carrils etiquetats "ES" corresponen a la digestió doble amb *EcoR I* i *Sal I*, els carrils etiquetats "BN" corresponen a la digestió doble amb *BamH I* i *Nde I*, els carrils etiquetats "b" corresponen al plasmidi sense digerir.

Els gels de la Figura 2.13 permeten la visualització dels resultats de l'anàlisi de restricció realitzat per a cada grup de transformants. En el cas del plasmidi pΔmg025, únicament un dels clons analitzats presenta el perfil de fragments esperable per a la lligació correcta de la construcció. Es tracta del clon 6. Tots els altres, inclosos els clons 1-4 pels quals no es mostren els resultats a la Figura 2.13, són el resultat de la recircularització del vector pUC18.

Pel que fa al plasmidi pΔmg060, s'analitzen les dues colònies obtingudes en la transformació, amb la fortuna que una d'elles presenta el patró de bandes que indica la lligació correcta del vector (clon 1). Per a l'altra clon s'aïlla el resultat de la recircularització de pUC18.

Finalment, en l'anàlisi de restricció de les 8 colònies transformants de pΔmg517 s'obtenen dos resultats positius, per als clons 1 i 3. Per als clons 2 i 4 la lligació genera quelcom que no es digereix amb cap de les dues parelles d'enzims de restricció i que resta igual que el vector pUC18 en el blanc de la reacció. En canvi, per als clons 5, 6 i 8, els perfils que s'observen demostren la recircularització del fragment de pUC18, mentre que per al clon 7 no és possible identificar l'origen de les bandes que els enzims de restricció provoquen.

Així doncs, es disposa de com a mínim una colònia transformant que conté la construcció correcta de cada plasmidi. Ara bé, per tal de demostrar de forma inequívoca l'obtenció de pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517, es procedeix a realitzar un segon control de confirmació mitjançant reaccions de PCR. En aquestes i per a cada plasmidi es pretén amplificar els dos braços de recombinació per separat (~1000 bp) i el conjunt dels dos braços més el gen *tetM438* que es troba entremig (~4000 bp). En el primer cas s'empren els mateixos encebadors ja utilitzats en l'obtenció dels braços a partir de l'ADN genòmic de *Mycoplasma genitalium* i en el segon, l'encebador 5' del RA i l'encebador 3' del LA. Les condicions sota les quals es desenvolupen les reaccions de PCR es recullen en el punt 8.1.6.2 de la *Part Experimental*.



A la Figura 2.14 es mostren els resultats obtinguts. En tots els casos s'obtenen les amplificacions esperades d'uns aproximadament 1000 bp per als braços i 4000 bp per al conjunt braços més gen de resistència.

Tenint en compte els resultats de les anàlisis de restricció i de les reaccions de PCR, es conclou que s'han generat amb èxit els plasmidis pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517, amb els quals es transformaran cèl·lules de *Mycoplasma genitalium* per tal d'obtenir per recombinació homòloga els *knock-outs* dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517* i estudiar la seva essencialitat en el desenvolupament del bacteri.

2.3 Obtenció dels *knock-outs* dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517* de *Mycoplasma genitalium*

Per tal d'obtenir els *knock-outs* dels tres gens de *Mycoplasma genitalium* descrits com a possibles glicosiltransferases, és a dir, *mg025*, *mg060* i *mg517*, cal seguir un procediment que es divideix en diverses etapes. La primera d'elles és la transformació de cèl·lules competents del micoplasma amb els plasmidis suïcides, l'obtenció dels quals s'ha detallat en el punt anterior del present treball. Un cop la recombinació homòloga entre els braços de recombinació del plasmidi i les mateixes zones situades a l'ADN genòmic del bacteri té lloc, els organismes viables creixen en forma de colònies de *Mycoplasma genitalium* en plaques de medi SP4 suplementades amb tetraciclina, ja que han incorporat el gen de resistència a aquest antibiòtic provinent de la recombinació amb el plasmidi. L'anàlisi de l'ADN d'aquests clons mitjançant la tècnica de Southern blott posarà de manifest l'èxit del procés i revelarà l'essencialitat del gen corresponent.

2.3.1 Transformació de cèl·lules competents de *Mycoplasma genitalium*

La transformació de cèl·lules del micoplasma amb els plasmidis pΔ*mg025*, pΔ*mg060* i pΔ*mg517* es fa mitjançant electroporació. Per aquest motiu es preparen cèl·lules competents de *Mycoplasma genitalium* seguint el protocol descrit en el punt 8.1.7.2 de la *Part Experimental*.

En el mateix punt també es descriu com s'aïlla l'ADN plasmídic de les tres construccions d'interès, el qual ha de trobar-se en una concentració força elevada per l'èxit de la transformació, i com té lloc el procediment, el qual finalitza quan les cèl·lules del bacteri ja transformades se sembren en plaques de medi SP4 sòlid suplementades amb tetraciclina i s'incuben a 37 °C i 5 % de CO₂ fins que s'observa l'aparició de colònies.

2.3.2 Anàlisi de les colònies transformants per Southern blott

El creixement de *Mycoplasma genitalium* en medi sòlid és lent i cal esperar tres setmanes per a la visualització de colònies derivades de la transformació de les seves cèl·lules amb els plasmidis pΔ*mg025*, pΔ*mg060* i pΔ*mg517*, respectivament. A la Taula 2.5 es presenta el nombre de colònies obtingudes i el nombre de colònies analitzades per Southern blott per a cadascun dels plasmidis.

Taula 2.5. Colònies obtingudes després de la transformació de cèl·lules de *Mycoplasma genitalium*.

Mostra	Número de colònies	Número de colònies analitzades
pΔ <i>mg025</i>	12	6
pΔ <i>mg060</i>	5	5
pΔ <i>mg517</i>	5	5

L'aparició d'una colònia en una placa suplementada amb tetraciclina no implica necessàriament l'obtenció del *knock-out* desitjat, ja que és possible que hagi tingut lloc una recombinació entre el plasmidi suïcida i l'ADN genòmic de *Mycoplasma genitalium*, però que aquesta no hagi estat doble, és a dir, pels dos braços de recombinació, sinó

simple, és a dir, per únicament un d'aquests braços. Una recombinació doble implica l'eliminació del gen en estudi i la introducció en l'ADN genòmic del gen de la resistència a la tetraciclina. Una recombinació simple, ja sigui pel braç dret o pel braç esquerre, també implica la incorporació a l'ADN genòmic del gen de resistència a l'antibiòtic, però en aquest cas sense que es produeixi l'eliminació del gen del micoplasma desitjat. Per tant, és necessari disposar d'un mètode que permeti l'anàlisi de l'ADN genòmic de les colònies transformants, per tal d'establir quina recombinació ha tingut lloc i si realment s'ha eliminat el gen d'interès i, en conseqüència, aquest no és essencial per l'organisme.

Aquest mètode és l'anàlisi per Southern blott, en el qual l'ADN genòmic de les colònies transformants es digereix amb un enzim de restricció i s'utilitza una sonda d'ADN marcada corresponent a un dels braços de recombinació per tal que hibridi amb la seva corresponent cadena complementària present en l'ADN genòmic, tot generant fragments d'una longitud determinada, la qual permet distingir entre una recombinació doble, una recombinació simple pel braç dret o una recombinació simple pel braç esquerre.

Les diferents sondes d'ADN s'han sintetitzat mitjançant reaccions de PCR en les quals s'ha emprat com a motlle el braç de recombinació corresponent, obtingut també per PCR i purificat a partir de la seva extracció d'un gel d'agarosa, i una mescla d'encebadors anomenats *random hexamers*, els quals presenten multitud de seqüències diferents. Aquest fet propicia que, tot i no haver estat dissenyats expressament per a la seqüència concreta dels braços de recombinació, puguin hibridar en algun punt i generar diferents fragments complementaris al motlle. Cal dir que el procediment inclou un pas de precipitació que permet eliminar fragments amplificats de mida petita, els quals podrien presentar hibridacions inespecífiques en altres punts de l'ADN genòmic aliens als braços de recombinació.

Fins aquí el procés permet obtenir fragments complementaris a l'ADN dels braços de recombinació, però aquests no podrien actuar com a sondes si no presentessin una marca detectable mitjançant alguna tècnica. Això s'aconsegueix usant en la reacció de PCR un nucleòtid marcat, en concret UTP unit a dioxigenina (dioxigenina-11-dUTP). La presència d'aquesta marca i un anticòs específic per ella conjugat amb fosfatasa alcalina permeten la visualització dels fragments d'ADN sobre els quals hibrida la sonda al final del protocol de Southern blott.

A continuació es presenta el disseny de les sondes i la predicció de fragments en una anàlisi per Southern blott per a cadascun dels *knock-outs* de *Mycoplasma genitalium*.

2.3.2.1 Knock-out per al gen *mg025*

En aquest cas es decideix emprar l'enzim *Hind III* per a la digestió de l'ADN genòmic de *Mycoplasma genitalium* i una sonda corresponent al braç de recombinació esquerre. A la Figura 2.15 es representen esquemàticament els fragments que es detectarien en un Southern blott en qualsevol dels casos possibles, és a dir, la no recombinació, la recombinació doble, la recombinació simple pel braç dret i la recombinació simple pel braç esquerre, els quals també es resumeixen a la Taula 2.6.

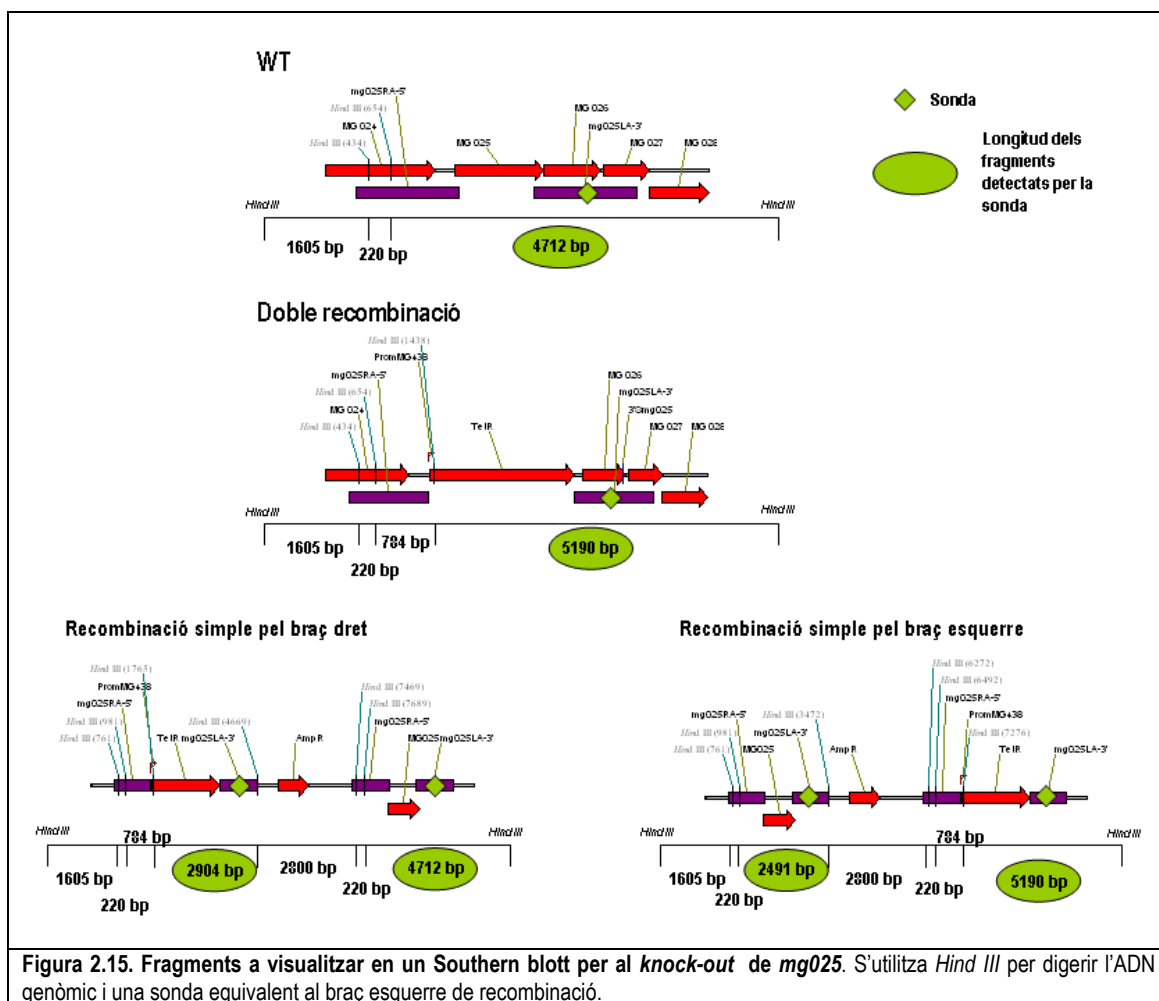


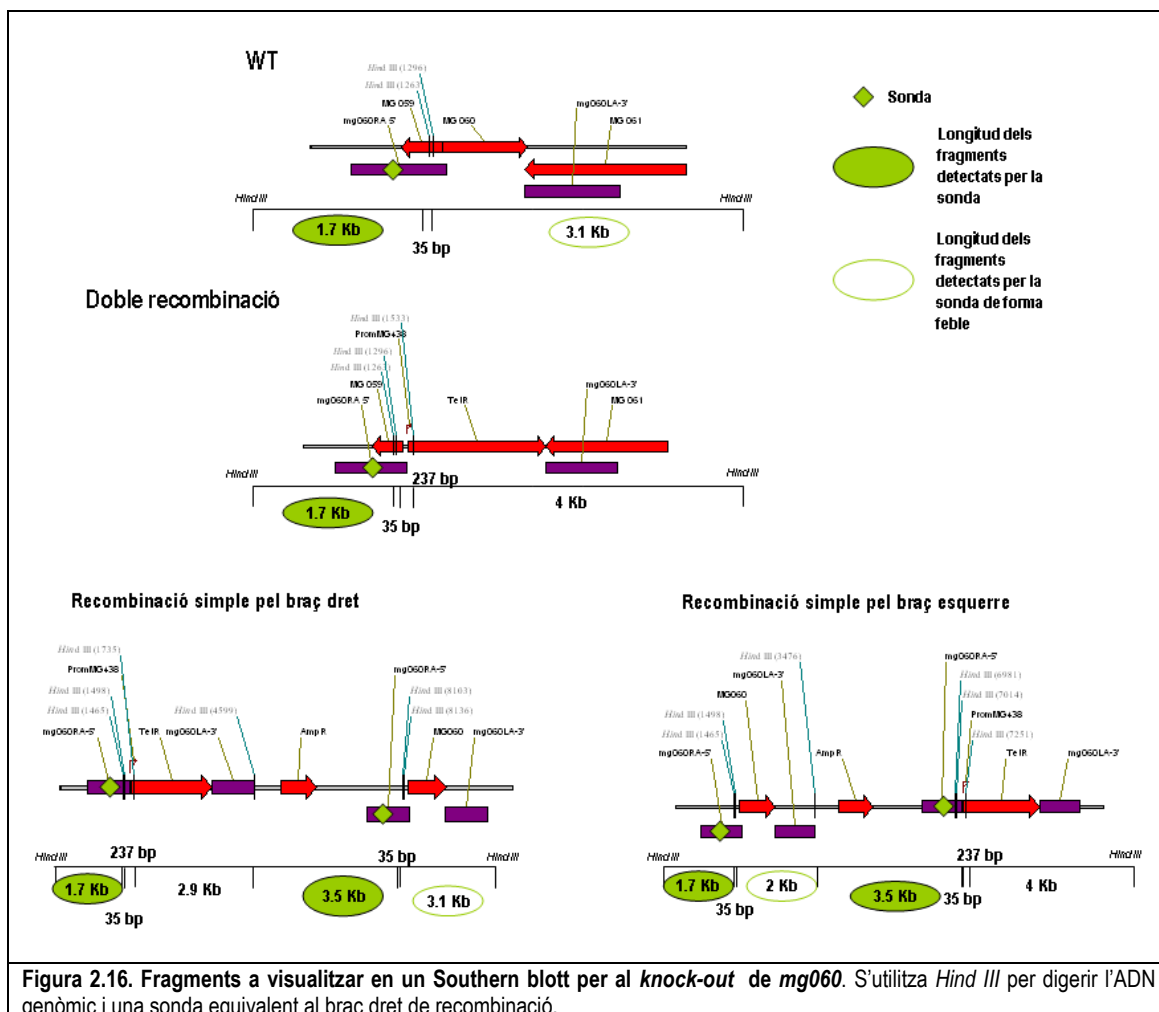
Figura 2.15. Fragments a visualitzar en un Southern blott per al knock-out de *mg025*. S'utilitza *Hind III* per digerir l'ADN genòmic i una sonda equivalent al braç esquerre de recombinació.

2.3.2.2 Knock-out per al gen *mg060*

Per a la detecció del knock-out de *mg060* s'escull com a sonda el braç de recombinació dret i per tal de digerir l'ADN genòmic, l'enzim de restricció *Hind III*. Els fragments que es visualitzarien en un Southern blott en cada cas possible es presenten a la Figura 2.16 i a tall de resum, es recullen també a la Taula 2.6.

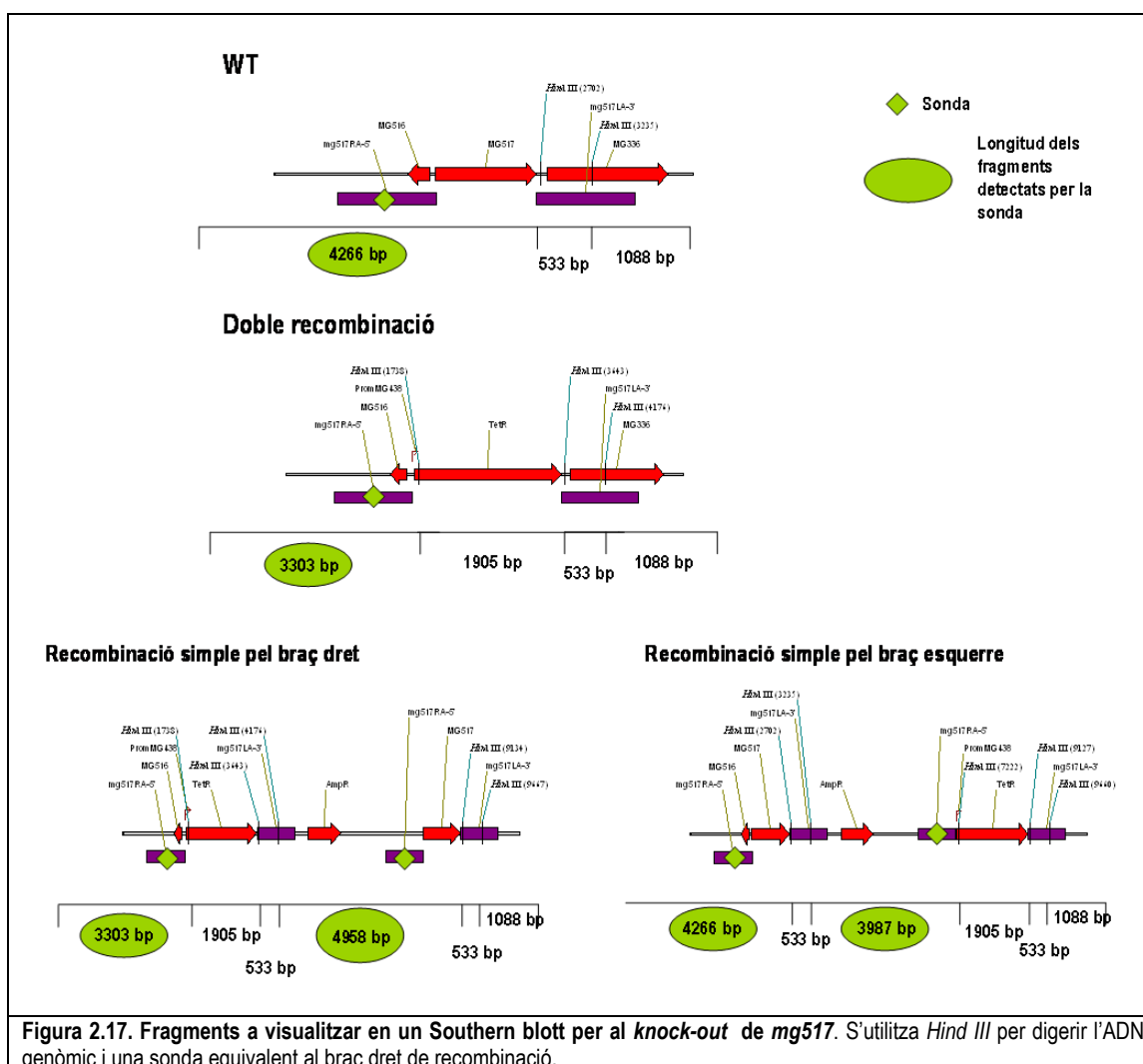
En aquest cas s'observa com alguns dels fragments únicament es detectarien de forma molt feble en un Southern blott. Aquest fet és degut que la sonda marcada només podria hibridar en una part molt petita del fragment, generant una intensitat de la marca dèbil. Així, per distingir entre una colònia sense mutació, és a dir on no ha tingut lloc cap

recombinació, i una en la qual ha tingut lloc una recombinació doble, caldria tenir en compte un dels fragments d'intensitat baixa esmentats. Tanmateix, cal pensar que seria la resistència a la tetraciclina la que distingiria entre els dos casos anteriors, i una colònia sense recombinació ja no apareixeria en una placa suplementada amb antibiòtic.



2.3.2.3 Knock-out per al gen *mg517*

Finalment a la Figura 2.17 es presenta un esquema dels fragments que es visualitzarien en un Southern blot realitzat amb una sonda corresponent al braç de recombinació dret sobre l'ADN genòmic d'una colònia transformant per al *knock-out* del gen *mg517* digerit amb l'enzim de restricció *Hind* III. La longitud dels fragments es recull també a la Taula 2.6.



2.3.2.4 Identificació dels fenòmens de recombinació per Southern blot

Per a cadascun dels clons analitzats, indicats anteriorment a la Taula 2.5, es realitza l'extracció de l'ADN genòmic tal com s'explica en el punt 8.1.2 de la *Part Experimental*. Aquest es digereix en tots els casos amb l'enzim de restricció *Hind III*, segons el procediment descrit en el punt 8.1.8 del mateix apartat. Els fragments resultants de la digestió se separen en un gel d'agarosa i es transfereixen a una membrana de niló, sobre la qual té lloc la hibridació de les sondes corresponents (punt 8.1.8.1 de la *Part Experimental*).

Per a cada *knock-out* s'ha escollit una sonda concreta, la qual facilita la distinció entre els diferents fenòmens de recombinació. En el cas de *mg025* s'ha sintetitzat una sonda corresponent al braç de recombinació esquerre, mentre que per als dos altres gens, *mg060* i *mg517*, la sonda preparada correspon al braç de recombinació dret. El protocol de síntesi de les sondes es presenta en el punt 8.1.8.2.1 de la *Part Experimental*, mentre que el d'hibridació, es recull en el punt 8.1.8.2.2.

A continuació es mostren a la Figura 2.18 els resultats dels Southern blots realitzats sobre l'ADN genòmic de les diferents colònies analitzades per a cada *knock-out*. A la Taula 2.6 es recullen els valors de tots els fragments

esperables en cadascun dels casos possibles, resumint el que gràficament s'ha representat a les Figures 2.15, 2.16 i 2.17.

Taula 2.6. Fragments a detectar en una anàlisi per Southern blott dels knock-outs dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517*.

Knock-out	Tipus recombinació	Longitud dels fragments (Kb)
<i>mg025</i>	no recombinació	4.7
	doble	5.2
	simple braç dret	2.9, 4.7
	simple braç esquerre	2.5, 5.2
<i>mg060</i>	no recombinació	1.7, 3.1(f)
	doble	1.7
	simple braç dret	1.7, 3.5, 3.1(f)
	simple braç esquerre	1.7, 2 (f), 3.5
<i>mg517</i>	no recombinació	4.3
	doble	3.3
	simple braç dret	3.3, 5
	simple braç esquerre	4.3, 4

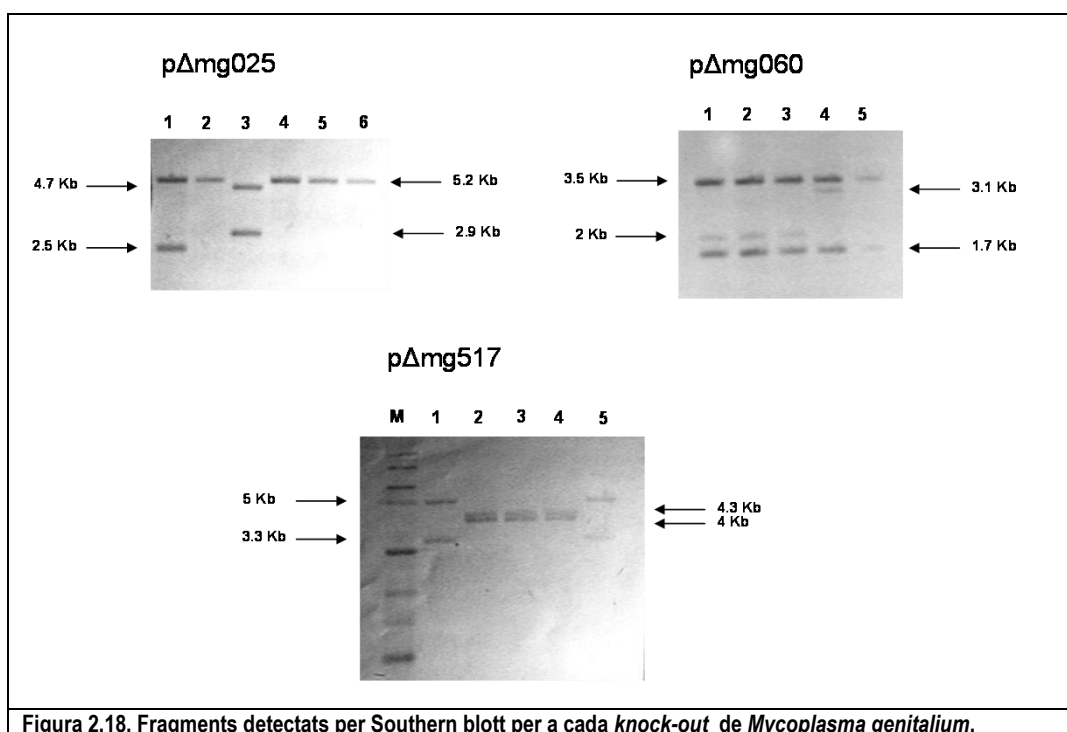


Figura 2.18. Fragments detectats per Southern blott per a cada knock-out de *Mycoplasma genitalium*.

Com es pot veure segons els diferents fragments que es revelen en el Southern, per al gen *mg025* han tingut lloc els tres fenòmens de recombinació que produeixen clons resistents a l'antibiòtic tetraciclina. En primer lloc, el clon 1 s'ha generat a partir d'una recombinació simple pel braç esquerre; en segon lloc, el clon 3 també s'ha generat a partir d'una recombinació simple, però en aquest cas pel braç dret. Finalment i el més interessant, són els clons 2, 4, 5 i 6, els quals presenten una única banda de 5.2 Kb, indicativa d'un fenomen de recombinació doble. Aquest fet indica que els esmentats clons són viables sense presentar en el seu ADN genòmic el gen *mg025* i, per tant, aquest pot considerar-se prescindible per al desenvolupament de *Mycoplasma genitalium*.

Pel que fa al knock-out de *mg060*, poden distingir-se dues poblacions de clons aïllades. D'una banda, la que comprèn els clons 1, 2 i 3, pels quals els fragments revelats en el Southern indiquen que s'han format a partir d'una recombinació simple pel braç esquerre. De l'altra, el clon 4, el qual també s'ha obtingut per recombinació simple,

però pel braç dret. En el cas del clon 5, no és possible determinar amb certesa quin fenomen de recombinació ha tingut lloc, degut a la poca quantitat d'ADN transferit a la membrana. No obstant, per la mida dels fragments que s'intueixen, es creu que el clon deriva d'una recombinació simple pel braç esquerre, de la mateixa forma que els clons 1, 2 i 3. En cap cas, però, pot correspondre a una recombinació doble. Per tant, i segons els resultats visibles per Southern blott, no és possible aïllar cap clon defectiu pel gen *mg060*, fet que el descriuria com a gen essencial per *Mycoplasma genitalium*.

Per últim, no s'obté cap clon per al *knock-out* de *mg517* que derivi d'una recombinació doble. Així, els clons 1 i 5 s'han produït a través d'una recombinació simple pel braç dret, mentre els clons 2, 3 i 4 ho han fet mitjançant una recombinació simple pel braç esquerre. Per tant, tots ells continuen posseint la còpia del gen *mg517* i en conclusió, aquest gen resulta essencial per al bacteri.

2.4 Conclusions

El genoma de *Mycoplasma genitalium* conté únicament tres gens codificats com a possibles glicosiltransferases: *mg025*, *mg060* i *mg517*. La funció dels dos primers no es coneix actualment, mentre que al nostre grup s'ha determinat l'activitat associada a *mg517*, el qual codifica per a la glicosiltransferasa encarregada de la síntesi dels glicolípidis de la membrana del micoplasma.

Segons els resultats obtinguts en aquest capítol, *mg060* i *mg517* són gens essencials per a *Mycoplasma genitalium*, mentre que *mg025* és prescindible. Com s'ha comentat en la introducció, l'estudi del conjunt mínim de gens essencials per a *Mycoplasma genitalium* mitjançant mutagènesi global per transposons realitzat l'any 2006 [Glass, J. I., *et al*, 2006] estableix que tots tres són essencials per al microorganisme, ja que no s'identifica cap inserció de transposó en la seva seqüència. Tanmateix, en el mateix estudi però realitzat l'any 1999 [Hutchison III, C. A., *et al*, 1999], sí que s'havia aïllat un clon amb una inserció en el gen *mg025*, conseqüència del qual en aquest article es qualificava el gen com a no essencial pel micoplasma, de la mateixa forma que indiquen els resultats obtinguts en la present tesi.

Cal comentar que, mentre l'aïllament d'un clon positiu per a un *knock-out* és indicatiu que aquell gen és prescindible per a l'organisme en estudi, la no obtenció de colònies en les quals s'hagi produït una doble recombinació pot ser simplement deguda que el nombre de colònies estudiat sigui petit i no hagi permès trobar un clon positiu. En el cas de la present tesi, per a *mg060* i *mg517* s'han analitzat únicament 5 colònies, totes les obtingudes. Aquest valor pot considerar-se baix i segurament per a un establiment més ferm de l'essencialitat d'ambdós gens, caldria repetir l'experiment de transformació i analitzar més colònies de *Mycoplasma genitalium*.

Ara bé, l'aïllament de clons defectius del gen *mg025* però viables obre la porta a l'estudi de quina és la funció de la proteïna que aquest codifica, a partir, per exemple, d'un anàlisi comparatiu entre els metabòlits existents en una soca Δ *mg025* i una soca salvatge.

En aquest sentit, *Mycoplasma pneumoniae*, el parent més pròxim de *Mycoplasma genitalium*, també posseeix tres gens classificats com a possibles glicosiltransferases. Per tots tres s'ha establert la seva homologia amb els de *Mycoplasma genitalium* d'acord amb la similitud de les seves seqüències. Així, el gen homòleg de *mg025* en *Mycoplasma pneumoniae* és *mpn028*, el gen homòleg de *mg060* és *mpn075* i el gen homòleg de *mg517* és *mpn483*.

Igual com en el nostre grup s'ha establert l'activitat de MG517 com a enzim productor de glicolípid, l'any 2007 es va presentar un treball en el qual s'atorgava a MPN483, la proteïna codificada pel gen *mpn483* en *Mycoplasma pneumoniae*, una activitat molt semblant [Rosén Klement, M., *et al*, 2007]. En l'estudi s'observava que cèl·lules d'*E.coli* que expressaven MPN483 no eren capaces de produir tots els glicolípid que produïen les cèl·lules del micoplasma *in vivo*. Els autors del treball proposaven com a hipòtesi que els altres dos gens del microorganisme anotats com a possibles glicosiltransferases, *mpn028* i *mpn075*, fossin els encarregats de sintetitzar aquells glicolípid no identificats en les cèl·lules d'*E.coli*, ja fos per acció directa o per modificació de productes creats per MPN483. Tanmateix, i donat que no havien pogut obtenir resultats satisfactoris en transformar cèl·lules d'*E.coli* amb els gens *mpn028* i *mpn075* i analitzar els seus glicolípid, reconeixien que o bé empraven altres donadors sacarídics diferents als provats en els seus experiments (UDP-Glc i UDP-Gal) o bé posseïen una funció diferent no relacionada amb la síntesi de glicolípid.

Quelcom semblant al que ocorre en *Mycoplasma pneumoniae* podria ser vàlid per a *Mycoplasma genitalium*, si bé cal fer més passos en la direcció d'establir les funcions de les proteïnes codificades per *mg025* i *mg060*. El fet que el primer d'ells no sigui essencial pel bacteri no proporciona cap informació sobre la seva activitat, però sí que proveeix d'una eina que pot ajudar a determinar-la en un futur.

Part I

Capítol 3: Estudi de la transcripció de les possibles glicosiltransferases de *Mycoplasma genitalium*

3 Estudi de la transcripció de les possibles glicosiltransferases de *Mycoplasma genitalium*

3.1 Introducció

Un cop estudiada l'essencialitat de les possibles glicosiltransferases de *Mycoplasma genitalium*, s'ha determinat que dues d'elles són imprescindibles pel bacteri, *mg060* i *mg517*, i que el tercer gen, *mg025*, codifica per una proteïna no essencial, ja que és possible aïllar clons viables en els quals el gen ha estat substituït per un marcador de selecció.

Aquest descobriment posa en dubte l'expressió de *mg025* per part del microorganisme, ja que si el gen posseeix una funció no essencial, pot ser que la proteïna per la qual codifica no s'expressi mai durant el creixement del micoplasma, si bé el procés de reducció genòmica que ha culminat en les espècies de micoplasma actuals sembla que hauria evitat el manteniment de gens que no es transcrivissin.

Amb l'objectiu d'establir si els gens de *Mycoplasma genitalium* classificats com a possibles glicosiltransferases es transcriuen al llarg de les diferents fases del creixement bacterià, es pensa en l'aplicació de la tècnica de RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*), la qual permet la detecció d'ARN missatger (mARN) transcrit a partir d'un gen concret, l'existència del qual implica directament l'expressió de la proteïna per la qual l'esmentat gen codifica.

Per als gens descrits com a essencials al final del capítol anterior s'espera un resultat positiu, si bé per a *mg025* no és tan obvi. Tanmateix diferències en la seva transcripció en funció de la fase de desenvolupament del bacteri podrien proporcionar informació sobre la seva funció.

3.1.1 Mecanismes de regulació de la transcripció en *Mycoplasma genitalium*

La seqüenciació dels genomes complets de *Mycoplasma genitalium* [Fraser, C., *et al*, 1995] i de *Mycoplasma pneumoniae* [Himmelreich, R., *et al*, 1996] ha permès la seva anàlisi a la recerca de sistemes de regulació dels mecanismes de transcripció gènica. L'absència del factor de terminació de la transcripció Rho i la presència d'un únic factor sigma en la seqüència d'ADN d'ambdós micoplasmes fa pensar que aquests microorganismes han desenvolupat sistemes de promoció i regulació de la transcripció diferents als d'altres bacteris [Weiner III, J., *et al*, 2000].

Tanmateix, és cert que no existeix un nombre ampli d'estudis en aquest sentit. Aquells realitzats han identificat l'existència de caixes -10 a l'extrem 5' de les zones codificadores de proteïnes (ORF – *open reading frames*), si bé no ha estat possible establir seqüències consens per a les caixes -35, presents habitualment en els promotors bacterians, ni la presència de zones d'unió per als ribosomes (RBS – *ribosome binding sites*) [Weiner III, J., *et al*, 2000]. Tampoc s'han identificat seqüències corresponents a possibles terminadors reconegudes en altres organismes, raó per la qual gens que no es troben relacionats funcionalment sovint formen part del mateix transcrypt, [Benders, G. A., *et al*, 2005]. Ara bé, recentment s'ha descrit un possible sistema de regulació consistent en el control de l'expressió d'un gen mitjançant la transcripció a partir de la seva cadena complementària [Lluch-Senar, M., *et al*, 2007]. Estudis en aquesta direcció haurien d'aportar una informació molt necessària per tal d'assolir una

comprensió més profunda de la regulació de la transcripció en organismes teòricament tan simples com els micoplasmes.

3.2 Reacció de RT-PCR: metodologia i disseny d'encebadors

El procediment a seguir per a la realització d'una reacció de RT-PCR inclou diversos passos, els quals es descriuen breument a continuació i es presenten esquemàticament en la Figura 3.1.

En primer lloc, cal purificar l'ARN de l'organisme en estudi, el qual en aquest cas és *Mycoplasma genitalium*. Tot seguit, es produeix la síntesi de l'ADN complementari (cADN) a partir de l'mARN corresponent al gen pel qual se'n vol analitzar la transcripció. Aquest pas té lloc gràcies a l'acció d'unat transcriptasa reversa, el qual a partir d'un encebador que hibrida en un punt determinat de la seqüència de l'mARN, és capaç de sintetitzar la cadena complementària al missatger, però utilitzant els nucleòtids propis de l'ADN.

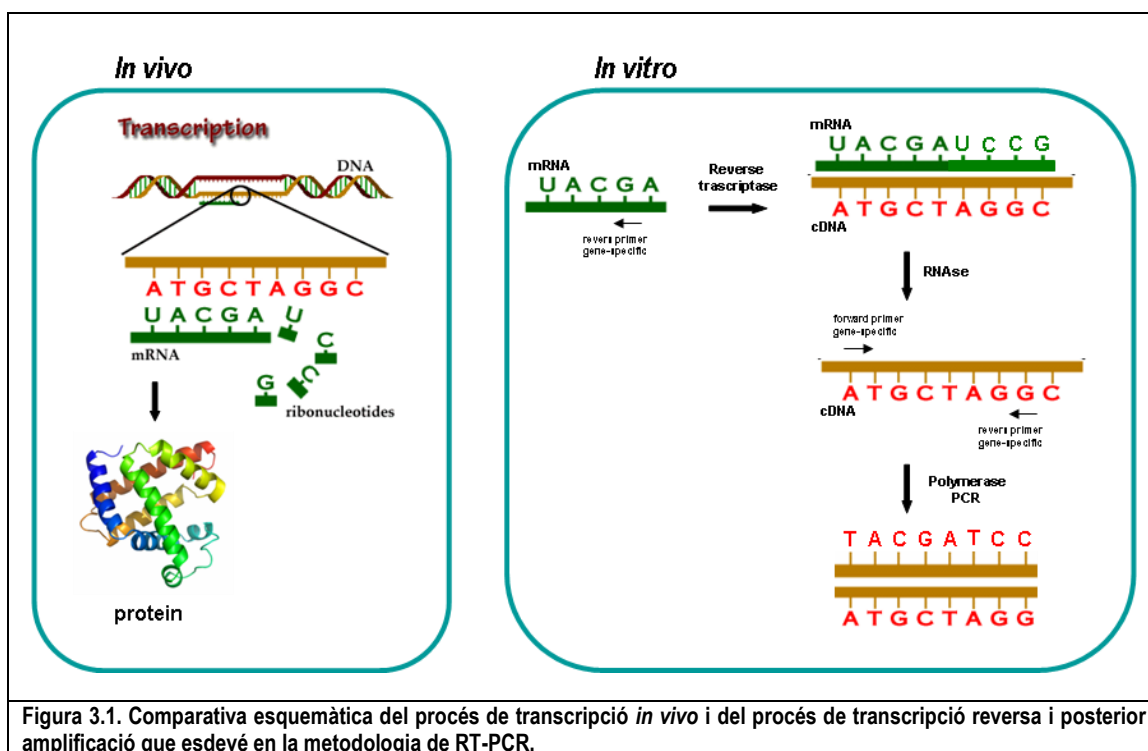


Figura 3.1. Comparativa esquemàtica del procés de transcripció *in vivo* i del procés de transcripció reversa i posterior amplificació que esdevé en la metodologia de RT-PCR.

En aquest punt cal dir que l'encebador pot dissenyar-se de tres formes diferents. Pot tractar-se d'un encebador específic per al gen en estudi i, per tant, complementari a una zona determinada del seu mRNA, pot tractar-se també d'un conjunt d'encebadors generats a l'atzar i formats per sis nucleòtids (*random hexamers*) o finalment, pot tractar-se d'encebadors poliT, els quals contenen únicament el nucleòtid timina per tal d'hibridar amb les cues poliA dels mRNA dels organismes eucariotes. En el primer dels casos, únicament es produeix cADN per al gen d'interès, mentre que per als altres dos dissenys d'encebador s'obté cADN per a tots els mRNA de l'organisme presents en l'ARN aïllat inicialment. Els encebadors poliT només poden usar-se quan el mRNA prové d'organismes eucariotes, ja que els mRNA dels procariotes no contenen les cues poliA en les quals s'hibriden els esmentats encebadors.

Un cop s'ha sintetitzat el cADN, el qual és de cadena simple, aquest es troba formant un híbrid amb el corresponent mRNA. Per tal que la reacció de PCR que tindrà lloc a continuació sigui més eficient, cal destruir l'esmentat híbrid mitjançant el seu tractament amb una RNAsa.

Finalment, la reacció que permet la detecció en últim terme de l'mARN és l'amplificació del cADN per PCR. En aquesta, que té lloc segons els protocols estàndards, s'utilitzen dos encebadors específics per al gen en estudi.

3.2.1 Disseny dels encebadors per a la reacció de RT-PCR sobre *mg025*, *mg060* i *mg517*

En organismes procariotes, com és el cas de *Mycoplasma genitalium*, l'estabilitat de l'mARN és força pobre. De fet, s'ha determinat que la vida mitjana de la majoria d'mARN és d'uns pocs minuts [Sheridan, G., *et al*, 1998]. Per aquest motiu, i davant de l'objectiu de detectar la presència d'un mARN concret, cal que l'encebador que es dissenyi amb aquesta finalitat es trobi en una zona central del gen, situat a un mínim de 200 bases del seu final. Un altre requisit que cal que compleixi l'esmentat encebador està condicionat per la temperatura de treball òptima de la transcriptasa reversa amb què es treballa, la qual és de 50 °C. Per un bon funcionament de la reacció de transcripció, cal que la temperatura d'hibridació de l'encebador sigui superior a aquest valor en un mínim de 5 °C.

Taula 3.1. Encebadors dissenyats per a les reaccions de RT i de PCR.

Encebador	Característiques				
	Longitud total (bp)	T _{fusió} (°C)	Distància respecte l'extrem (bp)	dG _{hib} (kcal/mol)	dG _{hib} dímer (kcal/mol)
<i>mg025 forward</i> 5'- GTGGCTCGTTTCTTTGGCCA-3'	20	54.7	324	-36.8	-8.2
<i>mg025 reverse</i> 5'- TTTTGGAGAATTTACACCAAGCA -3'	24	57.5	200	-39.7	-2.0
<i>mg060 forward</i> 5'- CTAGCAAAAGGGGAATGAGTAACAG -3'	25	54.7	249	-40.2	-2.0
<i>mg060 reverse</i> 5'- CAGATCCTTGCAGATTTGTACTTC -3'	24	51.8	195	-36.1	-2.0
<i>mg517 forward</i> 5'- GTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAG -3'	25	51.6	225	-37.2	-1.3
<i>mg517 reverse</i> 5'- CAAGAGAACCATTTTGGCTGAG -3'	22	53.2	263	-35.8	-0.3

A la Taula 3.1 es presenten els encebadors dissenyats per a la realització de la reacció de RT-PCR sobre l'ARN de *Mycoplasma genitalium* amb la finalitat de detectar la presència dels tres gens classificats com a glicosiltransferases: *mg025*, *mg060* i *mg517*. Cal dir que en la reacció de síntesi de l'cADN només s'empra l'encebador revers, ja que és aquest únicament el que pot hibridar amb el mARN. En la reacció de PCR és quan s'empra la parella d'encebadors dissenyats per a cada gen.

Pot observar-se com en la majoria de casos no ha estat possible complir amb la recomanació anterior, segons la qual la temperatura de fusió de l'encebador revers ha de ser igual o superior a 55 °C. Cal recordar que aquest valor es troba determinat pel contingut en G+C de l'encebador, el qual al seu torn, depèn de la mateixa característica, però del mottle, en aquest cas l'mARN. Anteriorment ja s'ha comentat que el contingut en G+C dels micoplasmes en general és molt baix en comparació al d'altres espècies i això repercuteix en la temperatura de fusió dels encebadors que han de dissenyar-se a partir de les seves seqüències d'ADN. A més, en aquest cas els encebadors han de trobar-se en una zona concreta del gen, allunyada un mínim de 200 bases dels seus extrems, fet que implica una disminució del nombre de possibilitats existents a l'hora de la tria de la seqüència de l'encebador. En la majoria dels casos ha estat necessari l'establiment d'un consens entre la posició de l'encebador en la seqüència del gen i la seva temperatura de fusió per tal de complir el màxim possible amb els requisits per a l'èxit de la reacció de RT-PCR.

D'altra banda, es necessari disposar d'un control positiu en les reaccions de RT-PCR. Amb aquesta finalitat s'escull un fragment de la sub-unitat 16S de l'ARN ribosòmic (rARN) de *Mycoplasma genitalium*, el qual es troba present amb tota seguretat en l'ARN aïllat del bacteri. Per a la detecció de l'esmentat fragment són necessaris dos encebadors que en permetin la transcripció reversa i l'amplificació, el disseny dels quals es presenta a la Taula 3.2.

Taula 3.2. Encebadors dissenyats per al control positiu de les reaccions de RT i de PCR.

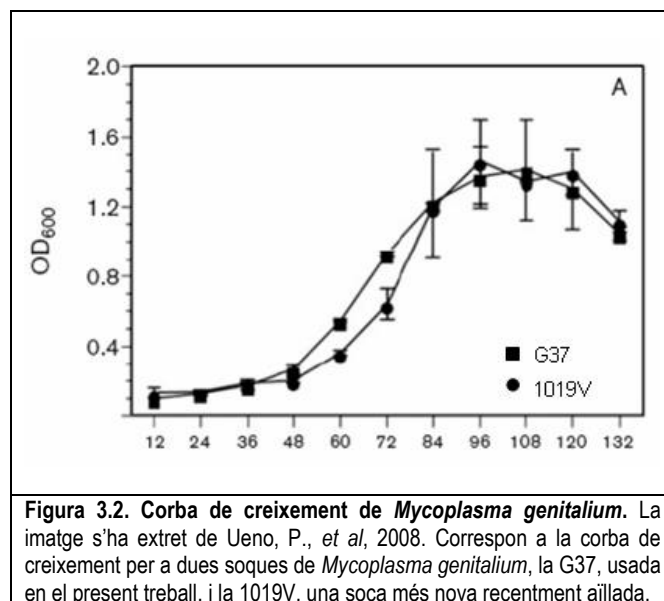
Encebador	Característiques				
	Longitud total (bp)	T _{fusió} (°C)	Distància respecte l'extrem (bp)	dG _{hib} (kcal/mol)	dG _{hib} dímer (kcal/mol)
16S rRNA forward					
5'- CGCGTGAACGATGAAGGTC -3'	19	53.8	401	-33.2	-5.4
16S rRNA reverse					
5'- GGGACTTAACCCAACATCTCACG -3'	23	56.3	426	-38.3	-3.5

3.3 Determinació de la transcripció de *mg025*, *mg060* i *mg517* en dues fases del creixement de *Mycoplasma genitalium*

La corba de creixement de *Mycoplasma genitalium* presenta l'aparença típica d'un creixement bacterià, en la qual poden distingir-se les fases de retard o *lag phase*, la qual presenta una durada aproximada de 2 dies, la fase de creixement exponencial, que s'expandeix des de les 48 fins a les 96 hores i la fase estacionària, la qual s'acaba aproximadament a les 120 hores, quan el microorganisme entra en mort cel·lular i té lloc la lisi de les cèl·lules (Figura 3.2).

Tal com s'ha comentat, es pretén determinar l'existència de transcripció en els gens de les glicosiltransferases del micoplasma en dues fases diferents del seu creixement, ja que la seva expressió pot venir determinada per l'estadi de desenvolupament del bacteri, en funció de l'activitat que s'associï a les proteïnes corresponents.

Les fases del creixement que s'escullen són 72 i 110 hores, és a dir, fase exponencial per al primer punt i fase estacionària per al segon.



3.3.1 Creixement del bacteri i aïllament de l'ARN

Es fan créixer dos cultius de *Mycoplasma genitalium* en medi ric SP4 a 37 °C i 5 % de CO₂. El primer d'ells (cultiu A) es manté en les condicions esmentades durant 72 hores per tal de representar la fase exponencial del creixement, mentre que pel segon (cultiu B) s'allarga la incubació fins a les 110 hores i així permetre la descripció del que ocorre en la fase estacionària.

Per tal d'aïllar l'ARN del bacteri s'empra el kit *RNAqueous 4PCR* d'Ambion. El mètode que aplica l'esmentat kit es basa en la disrupció de les cèl·lules del micoplasma mitjançant una solució que conté tiocianat de guanidini, un agent caotrópic desnaturalitzant fort, el qual lisa les membranes i ràpidament inactiva les ribonucleases que podrien degradar l'inestable ARN procariota. El lisat cel·lular es mescla amb una solució d'etanol i s'aplica a un filtre de sílice que uneix de forma selectiva i quantitativa l'mARN i els ARN ribosomals grans. Per contra, aquesta unió quantitativa no pot garantir-se pels ARN petits com els de transferència (tARNs) o l'ARN ribosomal de la subunitat 5S. El filtre es renta per eliminar l'ADN residual, proteïnes i altres possibles contaminants i l'ARN s'elueix amb aigua lliure de nucleases, però que conté traces d'EDTA per tal de quelar metalls pesants. Després de l'elució del filtre, l'ARN aïllat es tracta amb una DNasa amb l'objectiu d'eliminar restes d'ADN que provocarien falsos positius en la reacció de RT-PCR. El protocol complet es detalla al punt 8.2.1 de la *Part Experimental*.

La quantificació de l'ARN obtingut de cada cultiu s'ha realitzat mitjançant una mesura espectrofotomètrica, amb els resultats que es presenten a la Taula 3.3.

Taula 3.3. Quantificació espectrofotomètrica de l'ARN aïllat.

	[ARN] (pg/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Cultiu A	8.5	2.2
Cultiu B	23.6	1.9

Queda clar que en el cultiu que es troba en fase estacionària la quantitat de biomassa és superior, fet que explica perquè la concentració d'ARN que s'obté és gairebé tres vegades més elevada. La relació entre les absorbàncies de les mostres a 260 nm i 280 nm proporciona informació sobre la puresa d'aquestes, essent el valor òptim qualsevol comprès entre 1.8 i 2.1. Si s'observen els valors per als cultius A i B, es conclou que s'ajusten bé als valors anteriors i, per tant, l'ARN aïllat posseeix una qualitat suficient per a ser usat en el pas següent, és a dir, en la reacció de RT-PCR.

3.3.2 Reacció de RT-PCR

Per a la realització de la primera part del procés, és a dir, la reacció de transcripció que genera cADN a partir de l'mARN dels gens en estudi, es treballa amb el kit *SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR* d'Invitrogen.

Com s'ha comentat anteriorment, la transcriptasa reversa de l'esmentat kit presenta un òptim d'activitat a una temperatura de 50 °C, tot i que pot actuar en un interval de temperatures que va des de 42 °C fins a 55 °C. El kit incorpora un inhibidor d'RNases per tal d'augmentar el rendiment de la transcripció tot evitant la degradació de l'ARN motlle. Ara bé, un cop ha esdevingut la reacció, el kit inclou un pas d'eliminació d'aquest ARN motlle, el qual com es mostrava en la Figura 3.1, resta unit al recentment sintetitzat cADN. Aquest pas incrementa el rendiment de l'amplificació del cADN en la reacció de PCR que té lloc a continuació. Tots els detalls del procediment seguit es presenten en el punt 8.2.2 de la *Part Experimental*.

A la Taula 3.4 es presenten les longituds dels fragments que s'espera amplificar segons els encebadors dissenyats per a cada gen en estudi.

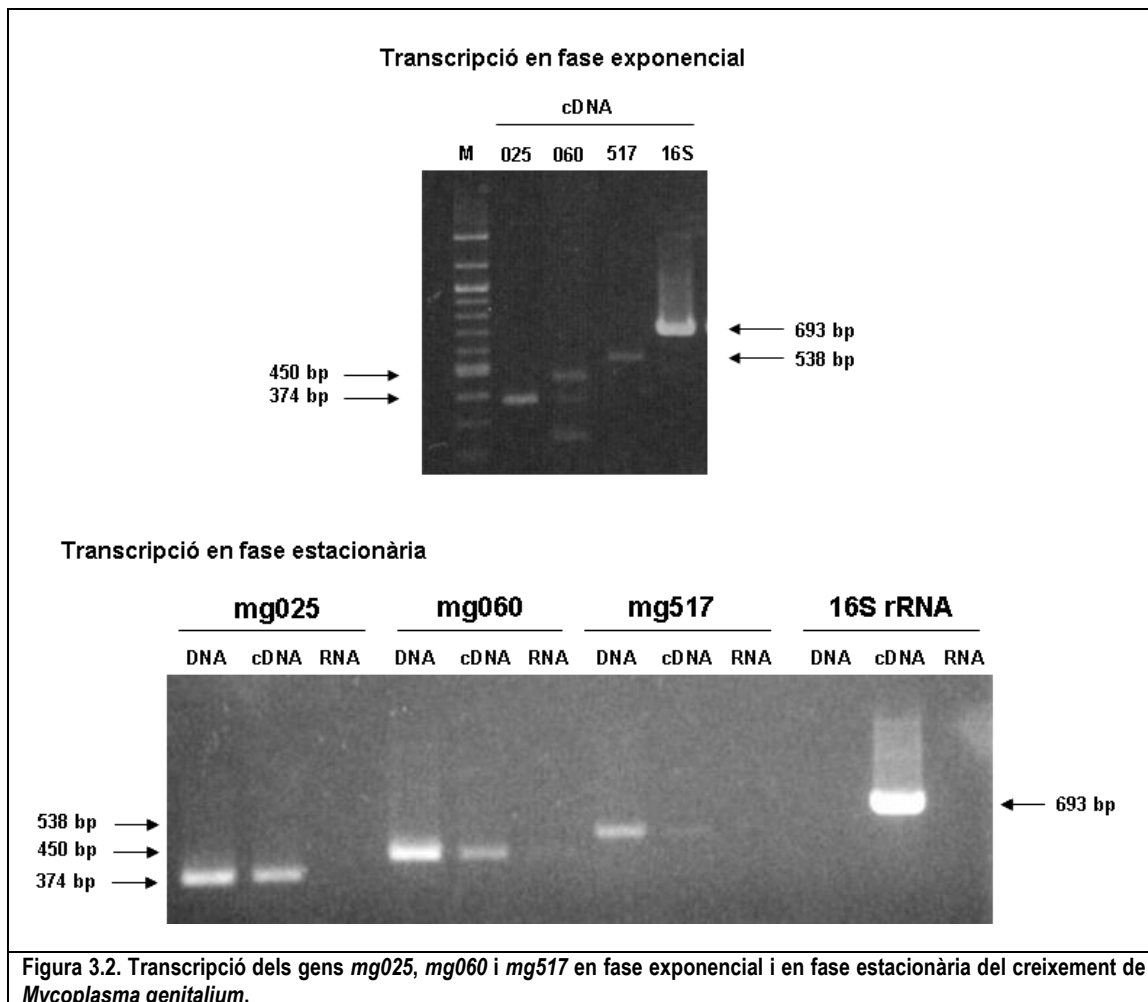
Taula 3.4. Longitud dels fragments a amplificar per PCR.

	Longitud (bp)
<i>mg025</i>	374
<i>mg060</i>	450
<i>mg517</i>	538
16S rARN	693

Els resultats de la transcripció de *mg025*, *mg060* i *mg517* en les dues fases del creixement de *Mycoplasma genitalium* es recullen a la Figura 3.3.

El primer dels gels inclou les amplificacions obtingudes per a les mostres en les quals s'ha treballat amb mARN provinent de la fase exponencial del creixement del micoplasma. S'observa com per als tres gens la banda amplificada correspon a la longitud esperada. Tanmateix, en el cas de *mg060*, a més del fragment previst segons el disseny d'encebadors, s'obtenen dues amplificacions més de menor pes molecular (364 bp i 261 bp). Aquestes podrien estar causades per hibridacions inespecífiques d'un o ambdós encebadors de la reacció de PCR, tot i que aquesta possibilitat ha tractat d'evitar-se en el moment del seu disseny. Una segona possibilitat que expliqués

l'aparició d'amplificacions de menor mida a l'esperada seria la formació d'una estructura secundària per part del cADN, en la zona interna a la flanquejada pels dos encebadors de la reacció. En qualsevol cas, l'amplificació més intensa és aquella que demostra la transcripció del gen en aquesta fase del creixement de *Mycoplasma genitalium*, de la mateixa forma que ocorre amb els altres dos gens en estudi, *mg025* i *mg517*.



Pel que fa a la transcripció en fase estacionària, a més de l'amplificació generada a partir del cADN obtingut de la RT, el gel d'agarosa inclou per a cada gen dos controls consistents per una banda, en l'amplificació del mateix fragment des de l'ADN genòmic de *Mycoplasma genitalium*, el qual remarca la presència del gen en estudi en el cromosoma del bacteri i, per l'altra, en l'amplificació del mateix fragment a partir de l'ARN usat com a motlle en la reacció de transcripció reversa. Aquest últim control és útil per tal d'assegurar la correcta eliminació de l'ADN de l'ARN total aïllat inicialment del bacteri. Cal pensar que la presència d'impureses d'ADN provocaria l'aparició de bandes corresponents als gens d'interès, tal com ocorre en l'amplificació en la qual el motlle és ADN genòmic del micoplasma.

Per a la fase de creixement estacionari de *Mycoplasma genitalium* també s'observa la transcripció dels tres gens en estudi, i en aquest cas per a *mg060* només es visualitza una única banda. Es pensa que la major quantitat d'ARN motlle en la reacció de transcripció reversa i, per tant, la major quantitat també de cADN en la reacció de PCR

afavoreix l'amplificació de la banda majoritària que s'observa en els resultats del cultiu provinent de la fase exponencial del creixement.

3.4 Conclusions

Segons els resultats exposats, els tres gens de *Mycoplasma genitalium* descrits com a possibles glicosiltransferases es transcriuen tant en la fase exponencial del seu creixement, com en la fase estacionària.

La transcripció de *mg025* en aquestes dues fases del creixement, indica que tot i que la seva funció no és essencial per al microorganisme, el gen s'expressa. Per tant, el micoplasma empra els seus recursos en aquesta activitat, posant de manifest que tot i ser considerat com un model d'organisme mínim, *Mycoplasma genitalium* disposa de funcions per a ell prescindibles però que en un entorn en el qual no hi ha pressió selectiva, com és el medi ric SP4 amb tots els nutrients necessaris per al seu desenvolupament i sense un sistema immunitari a evitar, no es beneficia de l'estalvi energètic que comportaria la seva eliminació. Caldria veure què ocorre *in vivo* durant la infecció per part del micoplasma d'un hoste determinat.

En el cas dels gens essencials, *mg060* i *mg517*, pot dir-se que el resultat obtingut és l'esperat, ja que si el microorganisme no pot desenvolupar-se sense la seva presència en el material genètic, és lògic que codifiquin per proteïnes que s'expressen sempre al llarg del seu creixement.

Pel que fa als nivells d'expressió, cal dir que la tècnica utilitzada no permet una quantificació fiable a partir de la intensitat de les bandes d'amplificació que pugui aportar informació en aquest sentit. Caldria una anàlisi mitjançant la tècnica de *real time* RT-PCR per tal de determinar quantitativament els nivells d'expressió de cada gen en cadascuna de les fases del creixement estudiades.

**PART II: Expressió,
purificació, estudi cinètic i
estructural de la
glicosiltransferasa de
Mycoplasma genitalium
GT-MG517**

Part II

Capítol 4: Expressió i purificació de

GT-MG517

4 Expressió i purificació de GT-MG517

4.1 Introducció

La glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* GT-MG517 és una proteïna que *in vivo* es troba associada a la membrana del microorganisme i que quan s'expressa de forma recombinant en *E. coli*, també se situa en aquesta estructura cel·lular [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007]. Aquest fet li confereix unes característiques que fan que el seu procés d'expressió i purificació no sigui trivial i requereixi l'ús d'estratègies més pròximes a proteïnes de membrana que a enzims solubles, les quals es desenvolupen al llarg d'aquest capítol.

Totes aquestes estratègies busquen complir bàsicament dos objectius. Per una banda, la purificació de GT-MG517 amb la finalitat de determinar l'estructura tridimensional de la proteïna per cristal·lografia de raigs x. Per l'altra, la seva purificació per a sotmetre l'enzim a un estudi cinètic que aportí informació sobre la seva activitat. La combinació d'ambdós coneixements permetrà aprofundir en el mecanisme d'acció de la glicosiltransferasa i en la seva regulació per part de l'entorn on se situa.

4.1.1 Antecedents: mètode previ d'expressió i purificació de GT-MG517

Ja des de l'inci en el nostre grup de l'estudi dels glicolípid de *Mycoplasma genitalium* i dels enzims que els produeixen va posar-se de manifest que l'expressió recombinant d'aquests en *E.coli* era complicada. Tanmateix, s'havia desenvolupat un protocol que permetia obtenir GT-MG517, tot i que amb uns rendiments i un grau de puresa que calia millorar si els objectius eren l'estudi cinètic de l'enzim i la seva cristal·lització [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007].

En l'esmentat protocol, que es recull en el punt 9.1.1 de la *Part Experimental*, GT-MG517 s'expressava a partir de cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 transformades amb el plasmidi pET517HisC (Figura 4.1). En aquest plasmidi el gen *mg517* es troba sota el control del promotor T7 i incorpora a l'extrem C-terminal de la seqüència d'aminoàcids una cua de 6 His per tal de facilitar-ne la purificació per cromatografia d'afinitat. Previs a aquestes histidines, la construcció afegeix dos aminoàcids addicionals, els quals es marquen en color a la Figura 4.1.

La inducció de l'expressió de GT-MG517 tenia lloc després d'un xoc tèrmic. Aquest, que tenia l'objectiu de provocar una situació d'estrès cel·lular que causés l'expressió de les xaperones pròpies d'*E.coli*, s'havia demostrat necessari per obtenir l'enzim soluble i disminuir la quantitat de proteïna que quedava en forma d'agregats insolubles [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007].

La proteïna expressada es recuperava mitjançant la lisi cel·lular per sonicació amb un tampó d'extracció de composició 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl i 20% glicerol i una cromatografia d'afinitat per Ni. GT-MG517 s'eluïa amb diferents graons d'imidazole a partir d'un tampó 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 20% glicerol i 500 mM imidazole, essent la fracció considerada òptima aquella corresponent a una concentració de 250 mM d'imidazole (Figura 4.2).

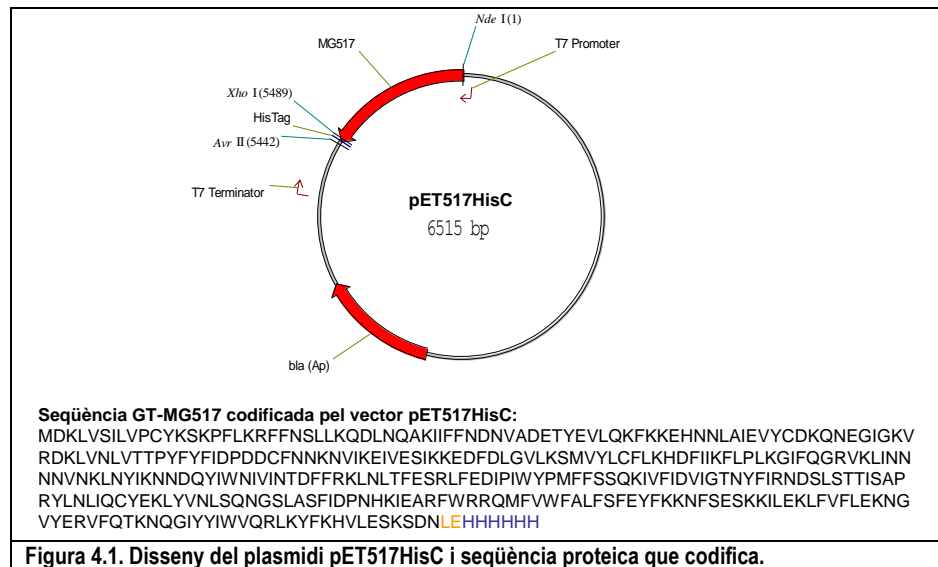


Figura 4.1. Disseny del plasmidi pET517HisC i seqüència proteica que codifica.

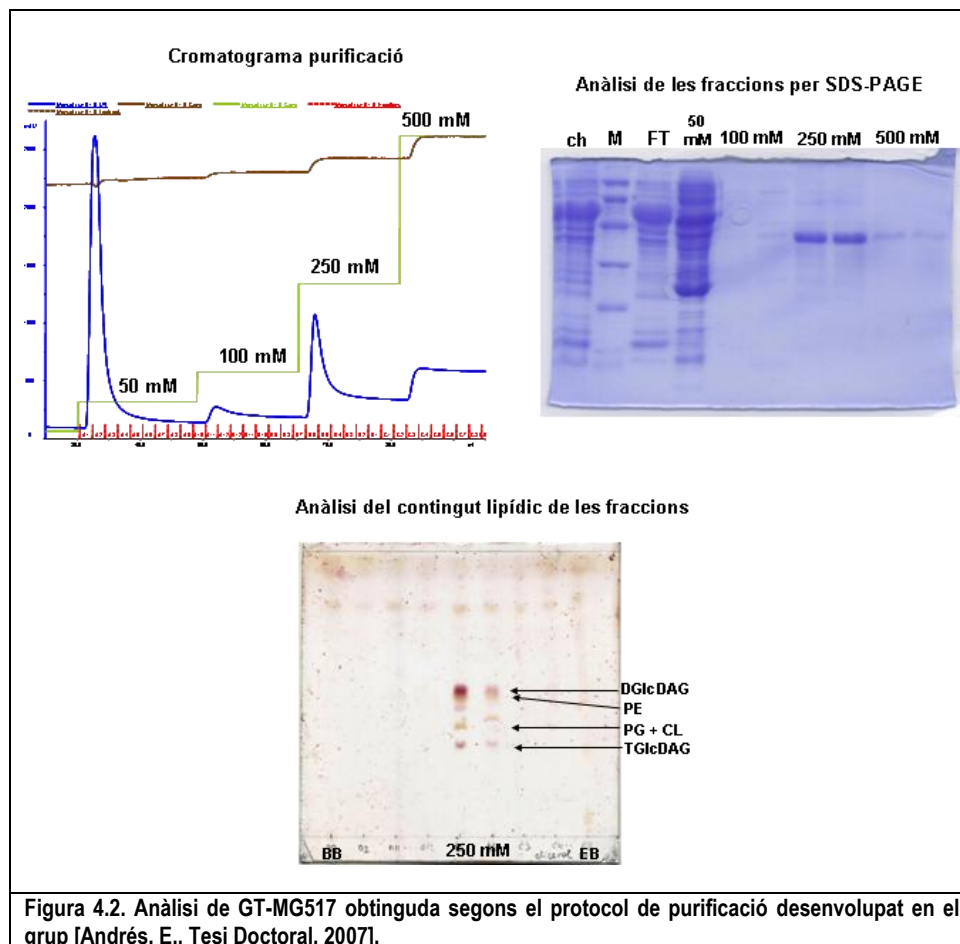


Figura 4.2. Anàlisi de GT-MG517 obtinguda segons el protocol de purificació desenvolupat en el grup [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007].

Els problemes que presentava aquest protocol d'expressió i purificació per a GT-MG517 es resumeixen bàsicament en tres punts:

- Obtenció d'una quantitat baixa de proteïna. El rendiment d'un cultiu estàndard es trobava al voltant dels 2 mg de proteïna per litre de cultiu.

- Puresa insuficient. A més, el fet de disposar de tan poca quantitat de proteïna feia difícil l'acoblament d'un altre mètode de separació a continuació de la cromatografia d'afinitat.
- Coelució de la proteïna amb lípids de membrana. Aquest punt es va comprovar realitzant una extracció amb cloroform/MeOH de les diferents fraccions de proteïna eluïdes de la columna. Com es pot veure a la TLC de la Figura 4.2, GT-MG517 coelueix amb dos dels seus productes de síntesi (DGlcDG i TGlcDG) i diversos lípids de les membranes d'*E.coli*, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) i cardiolipina (CL). Aquest fet implicava l'existència de poblacions diferents de proteïna, en funció de la quantitat de lípids que l'acompanyessin i explicava perquè en realitzar una cromatografia de bescanvi iònic, GT-MG517 apareixia en totes les fraccions, tal com si l'enzim existís en diferents formes, cadascuna amb un pl característic [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007].

Així doncs era necessari el desenvolupament d'un mètode d'expressió de la glicosiltransferasa que augmentés el rendiment de producció de proteïna soluble. Si s'aconseguia obtenir una quantitat més gran de proteïna, podrien realitzar-se més passos de purificació en cas que fossin requerits i, per tant, es milloraria la puresa de GT-MG517. Finalment, per tal de facilitar tots els processos de purificació i aïllar una població de proteïna homogènia, calia eliminar els lípids acompanyants de la glicosiltransferasa. Amb aquestes premisses es va procedir al disseny d'un nou mètode d'expressió i purificació de GT-MG517.

4.2 Coexpressió de GT-MG517 amb xaperones

En un treball anterior ja s'havia demostrat el requeriment de l'expressió de les xaperones d'*E.coli* per tal d'aconseguir disminuir la quantitat de GT-MG517 que s'expressava en forma d'agregats insolubles [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007].

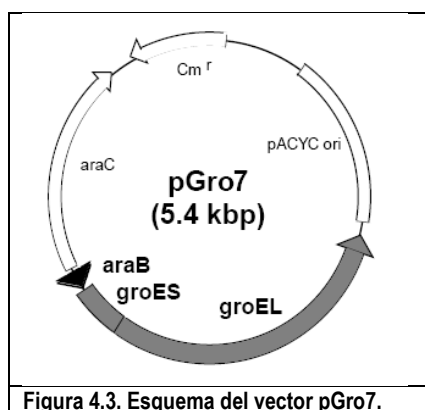
Les xaperones són proteïnes que participen en el procés de plegament de cadenes polipeptídiques de nova síntesi, tot evitant interaccions hidrofòbiques no productives i facilitant que les esmentades cadenes puguin adquirir la seva estructura terciària correcta. *E.coli* disposa de dos sistemes diferents de xaperones, el sistema DnaK (Hsp70) format per DnaK i les seves co-xaperones DnaJ i GrpE, i el sistema GroEL (Hsp60) / GroES. L'expressió d'aquestes proteïnes s'activa en situacions d'estrès cel·lular, com ara elevades temperatures, les quals poden afectar la conformació proteica. El seu funcionament es troba induït per ATP i es basa en generar canvis conformationals sobre estructures proteiques no natives, les quals adquireixen la seva estructura funcional mitjançant processos de plegament/desplegament actuant com a substrats de les xaperones. La sobreexpressió d'una proteïna recombinant en *E.coli* pot superar les capacitats de les xaperones pròpies del microorganisme portant a l'acumulació d'agregats de la proteïna recombinant en forma de cossos d'inclusió. Una bona manera de vèncer aquest problema és la sobreexpressió de xaperones paral·lelament a la sobreexpressió de la proteïna d'interès [Kyratsous, C.A., *et al*, 2009].

Existeixen molts exemples en bibliografia on s'aplica aquesta metodologia per tal de millorar la quantitat de proteïna soluble que es recupera com a resultat d'una sobreexpressió en *E.coli*. En alguns casos, la coexpressió de les

xaperones s'aconsegueix a partir de la cotransformació de les cèl·lules bacterianes amb dos plasmidis, un que codifica pels gens de les xaperones i l'altre que ho fa per al gen de la proteïna d'interès [Nishihara, K., *et al*, 2000; Venkatesh, B., *et al*, 2004; Wang, J., *et al*, 2006; Yoon, S., *et al*, 2002; Paul, S. i Chaudhuri, T.K., 2007; Lee, H., *et al*, 2004; Barroso, J., *et al*, 2003]. L'èxit d'aquesta estratègia passa perquè els dos plasmidis utilitzats tinguin diferents orígens de replicació, gens de resistència a diferents antibiòtics i promotors induïbles de forma compatible. D'aquesta forma és possible cotransformar cèl·lules d'*E.coli*, seleccionar aquelles que continguin els dos plasmidis i controlar el procés d'expressió, tant de la proteïna d'interès com de les xaperones, ja que un excés de sobreexpressió pot afectar de forma negativa el creixement cel·lular i convertir-se en tòxic per al microorganisme productor.

Una estratègia diferent però que s'ha demostrat igualment vàlida per a augmentar la quantitat de proteïna recombinant soluble recuperada, és la coexpressió amb xaperones en forma de proteïnes de fusió amb la proteïna d'interès [Ahn, T. i Yun, C., 2004; Kyratsous, C.A., *et al*, 2009]. En aquests casos, ambdós gens es troben en el mateix plasmidi, fet que minimitza la disminució en la velocitat de creixement que provoca en *E.coli* la presència de més d'un plasmidi a l'interior de les cèl·lules.

Per tal d'aplicar-la a la sobreexpressió de GT-MG517 s'ha escollit la primera de les estratègies, és a dir, la coexpressió de la glicosiltransferasa i un dels sistemes de xaperones d'*E.coli*, el sistema GroEL/GroES, cotransformant cèl·lules d'*E.coli* amb dos plasmidis: pET517HisC, el qual expressa GT-MG517 amb una cua d'His a l'extrem C-terminal i pGro7, un plasmidi comercial [Nishihara, K., *et al*, 1998] que expressa les xaperones GroEL i GroES (Figura 4.3).



La compatibilitat d'ambdós plasmidis és possible ja que posseeixen orígens de replicació i promotors diferents i confereixen a les cèl·lules que els contenen resistència a antibiòtics també diferents, tal com es pot veure a la Taula 4.1. En el vector pET517HisC la inducció de l'expressió de la glicosiltransferasa té lloc mitjançant l'addició d'IPTG, mentre que en el vector pGro7 es controla a partir de l'addició de L-arabina.

Taula 4.1. Característiques dels plasmidis per a la coexpressió de GT-MG517 amb xaperones.

Plasmidi	Gen	Promotor	Marcador de selecció	Origen de replicació
pET517HisC	mg517	T7	Ampicilina	ColE1 (pBR322)
pGro7	groEL, groES	araB	Cloramfenicol	P15A (pACYC)

4.2.1 Comparativa de l'expressió de GT-MG517 amb i sense l'ús de xaperones

Per tal de quantificar la millora que representa la introducció de la coexpressió amb xaperones en l'expressió de GT-MG517 soluble i funcional, s'ha comparat l'activitat específica de dos extractes proteics provinents de dos cultius diferents, A i B. En el primer d'ells (A), l'expressió de GT-MG517 s'ha dut a terme seguint del protocol anterior en el qual s'indueix l'expressió de les xaperones d'*E.coli* mitjançant un xoc tèrmic. En el segon cultiu (B), l'expressió ha tingut lloc a partir de cèl·lules d'*E.coli* cotransformades amb els dos plasmidis pET517HisC i pGro7 i que, per tant, sobreexpressen tant la proteïna d'interès com les xaperones GroEL i GroES. El protocol de creixement del cultiu B és el descrit com a òptim pel subministrador comercial de pGro7, ja que les condicions d'inducció d'aquest plasmidi no han estat optimitzades.

Per tal de facilitar-ne la comparació, a la Taula 4.2 es resumeixen les condicions de creixement i inducció dels cultius A i B. En els punts 9.1.1 i 9.1.2 de la *Part Experimental* es descriuen de forma més detallada.

Taula 4.2. Condicions de creixement i inducció per a l'expressió de GT-MG517.

Cultiu A – Xoc tèrmic	Cultiu B – Coexpressió xaperones
Cèl·lules BL21 DE3 transformades amb pET517HisC	Cèl·lules BL21 DE3 transformades amb pET517HisC i pGro7
Creixement a 37 °C en LB Amp fins a OD = 0.3	Creixement a 37 °C en LB Amp Cm fins a OD = 0.4
Xoc tèrmic – 30 min 42 °C	Inducció xaperones amb 0.2% L-arabinosa
-	Incubació 30 min a 37 °C
Inducció expressió GT-MG517 amb 1 mM IPTG	Inducció expressió GT-MG517 amb 1 mM IPTG
Incubació O/N a 20 °C	Incubació O/N a 30 °C

Els valors d'activitat específica de GT-MG517 en extracte de cadascun dels cultius anteriors es mesuren mitjançant l'assaig radiomètric desenvolupat en la present tesi i descrit àmpliament en el Capítol 5 "*Estudi cinètic de l'activitat enzimàtica de GT-MG517*". A la Taula 4.3 es presenten els resultats obtinguts, pels quals es determina que, si bé la quantitat de proteïna total no varia significativament en els extractes, l'activitat específica que es recupera pel cultiu on GT-MG517 es coexpressa amb xaperones és pràcticament dues vegades superior que la que proporciona l'extracte del cultiu sotmès a xoc tèrmic.

Taula 4.3. Comparativa d'activitat específica.

	[prot tot] _{BCA} (mg/mL)	a _{esp} -UDP-Gal (U/mg _{prot tot})	U _{extracte}	U _{extracte} relatives
Cultiu A Xoc tèrmic	8.9	0.131	2.91	57
Cultiu B Xaperones	9.5	0.216	5.14	100

Volum cultiu: 50 mL; volum extracte soluble: 2.5 mL; tampó d'extracció: 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 22 mM CHAPS i 10% glicerol; condicions assaig d'activitat: 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG, 12.5 mM DOPG, 1 mM UDP-¹⁴C-Gal, 4 µg proteïna total i T=35 °C.

Aquest fet implica que la coexpressió de GT-MG517 amb les xaperones GroEL i GroES d'*E.coli* disminueix la tendència de la proteïna a formar agregats insolubles degut a l'associació de zones hidrofòbiques de la seqüència d'aminoàcids. Per tant, més molècules d'enzim es troben plegades de forma correcta i són funcionals.

La disminució de la quantitat de proteïna present en la fracció insoluble s'ha comprovat mitjançant un gel de SDS-PAGE (Figura 4.4).

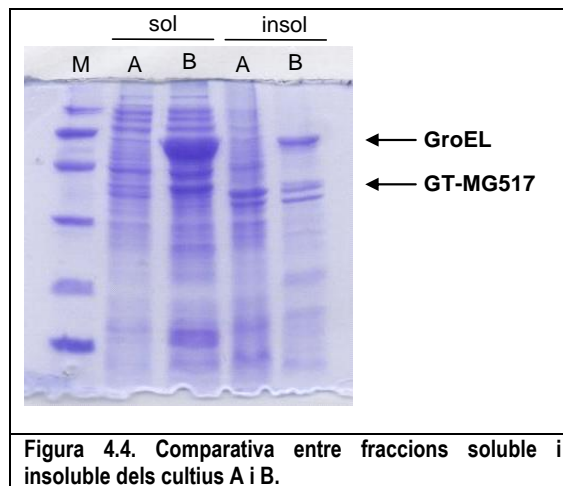


Figura 4.4. Comparativa entre fraccions soluble i insoluble dels cultius A i B.

Per una banda la coexpressió amb les xaperones d'*E.coli* augmenta la quantitat total de proteïna GT-MG517 que s'obté. De l'altra, augmenta també la fracció d'aquesta que és solubilitzada pel tampó d'extracció, tot disminuint els agregats insolubles que es formaven amb el mètode del xoc tèrmic. En el gel de la Figura 4.4 s'observa la sobreexpressió de la xaperona GroEL (57.3 kDa) en la fracció soluble del cultiu B, no així la de GroES, la qual pel seu pes molecular (10.4 kDa) avança amb el front d'elució i surt fora del gel.

Davant dels resultats obtinguts, es conclou que la coexpressió de GT-MG517 amb les xaperones GroEL i GroES millora de forma molt important, tant la quantitat total de glicosiltransferasa que es produeix com la fracció d'aquesta que pot ser solubilitzada pel tampó d'extracció i es manté activa.

4.3 Detergents per a la solubilització de proteïnes associades a membrana

Les proteïnes de membrana poden classificar-se com a monotòpiques, bitòpiques i politòpiques, en funció del tipus d'interacció que presentin amb aquesta estructura cel·lular. Les proteïnes monotòpiques únicament interactuen amb una de les capes de la bicapa lipídica, mentre que les bitòpiques i politòpiques tenen un o més segments que s'expandeixen a través de la bicapa completa (Figura 4.5) [Blobel, G., 1980].

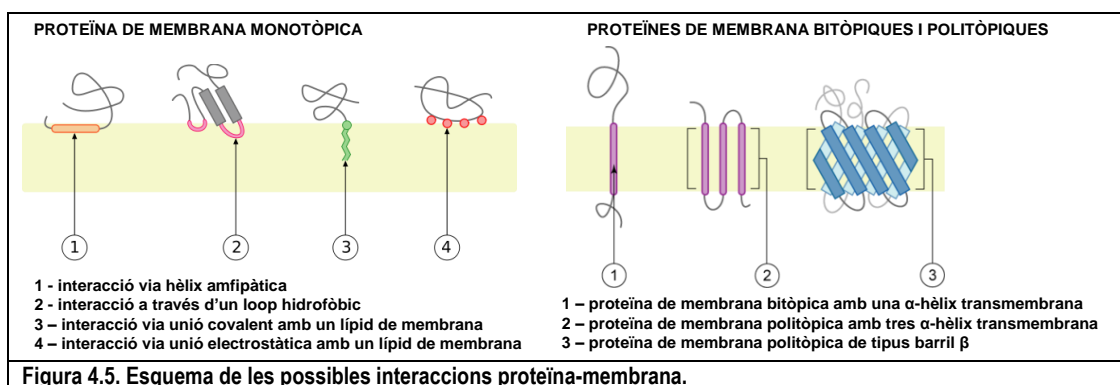
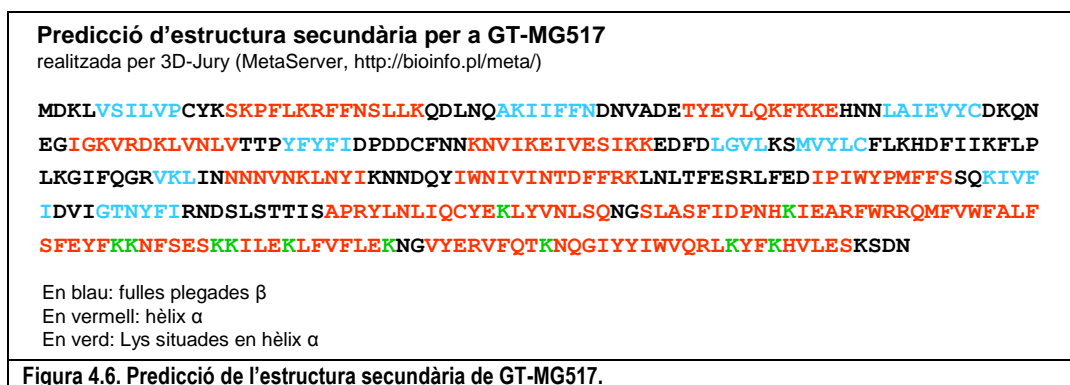


Figura 4.5. Esquema de les possibles interaccions proteïna-membrana.

Com ja s'ha comentat, s'han trobat evidències que *in vivo* GT-MG517 es troba associada a la membrana de *Mycoplasma genitalium* i que quan s'expressa de forma recombinant en *E.coli* també s'associa a la bicapa lipídica del microorganisme, ja que és en aquesta fracció cel·lular on es detecta principalment l'activitat de síntesi de glicolípid [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007].

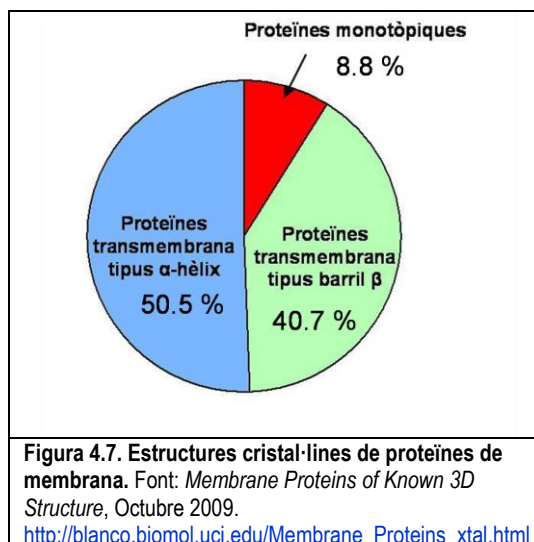
Quan es realitzen anàlisis de la seqüència proteica de la glicosiltransferasa mitjançant eines bioinformàtiques capces de predir dominis transmembrana, els resultats per a GT-MG517 són sempre negatius. Per tant, sembla que la seva interacció amb la membrana hauria de donar-se d'alguna altra forma. En el cas de la MGlcDG sintasa d'*Acholeplasma laidlawii* [Lind, J. *et al*, 2007] i de MPN483, la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae* homòloga a GT-MG517 [Rosén Klement, M. *et al*, 2007], es proposen com a punts d'interacció aminoàcids carregats positivament, especialment Lys, presents en hèlix amfipàtiques de la seqüència proteica.

En la predicció d'estructura secundària per a GT-MG517 que es presenta a la Figura 4.6 es detecta un elevat nombre de Lys a la zona C-terminal de la proteïna, les quals segons la predicció formarien part d'una llarga hèlix α . Per tant, i per analogia a la hipòtesi que s'aplica a les glicosiltransferases esmentades en el paràgraf anterior, es proposen aquestes hèlix com a possibles punts d'unió entre la bicapa lipídica de la membrana plasmàtica i la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium*.



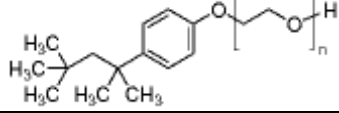
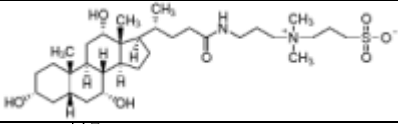
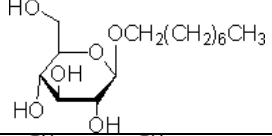
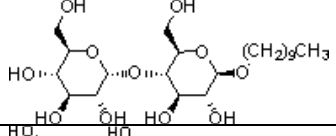
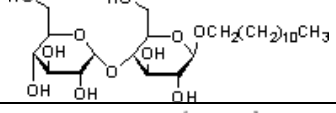
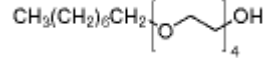
És àmpliament coneguda la necessitat d'utilitzar detergents quan es treballa amb proteïnes de membrana, ja que aquests actuen com a substituïts de la bicapa lipídica i idealment mantenen la proteïna d'interès plegada i funcional [Rosenow, M. A., *et al*, 2002].

Ara bé, podria pensar-se que les proteïnes associades a la interfície de la membrana (monotòpiques), com és el cas de GT-MG517, han de ser més fàcilment manejables, en comparació amb aquelles que es troben introduïdes completament a la bicapa lipídica (bitòpiques i politòpiques). Aquesta facilitat de treball es veuria reflectida en el requeriment de quantitats inferiors de detergent per a solubilitzar-les i mantenir-les estables i amb una menor tendència a formar agregats insolubles en el moment de ser expressades de forma recombinant en un organisme com *E.coli* [Eriksson, H. M., *et al*, 2009]. No obstant, el nombre d'estructures de proteïnes monotòpiques cristal·litzades actualment (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html - *Membrane Proteins of Known 3D Structure* - Octubre de 2009) desmenteix aquesta hipòtesi, ja que de les prop de 200 estructures disponibles de proteïnes de membrana, només 18 són de proteïnes monotòpiques (Figura 4.7).



L'ús de detergents en el procés d'aïllament d'una proteïna associada a membrana és requerit des del moment de la seva solubilització de la membrana de l'organisme emprat per a la seva expressió, continua durant el procés de purificació i caracterització funcional i es manté en totes les proves necessàries per al desenvolupament d'un protocol de cristal·lització satisfactori. Ara bé, és molt possible que un mateix detergent no sigui vàlid per a tots els supòsits descrits, ja que per a cada funció es descriuen unes característiques del detergent a utilitzar diferents i relatives a les seves propietats físico-químiques.

Taula 4.4. Resum de les característiques dels detergents emprats en el present treball.

Detergent	Estructura química	Natural cap polar	PM	CMC _{aigua} (mM)	Nombre agregació
Triton x-100		No iònic	625	0.2 – 0.9	100 - 150
CHAPS		zwitteriònic	615	6	10
OG		No iònic	292	20 – 25	84
DM		No iònic	483	1.6	69
DDM		No iònic	511	0.15	98
C ₈ E ₄		No iònic	306	8	82

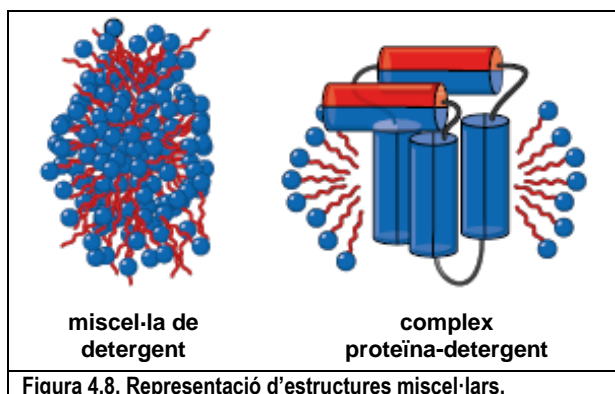
CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonij]-1-propansulfonat; OG: octil-β-D-glucopiranosid; DM: decil- β-D-maltopiranosid; DDM: n-dodecil- β-D-maltòsid; C₈E₄: octiltetraoxietil·lè

No existeix un detergent universal que sigui capaç d'aconseguir una solubilització òptima per a totes les proteïnes associades a membrana. Per això, el procediment més comú davant el repte de purificar una nova proteïna és la prova de diferents compostos. Dels múltiples detergents que existeixen actualment al mercat, a la Taula 4.4 se'n recullen les característiques d'aquells que s'han usat al llarg del present treball.

Una classificació molt habitual dels detergents és en funció de la naturalesa del seu cap polar. Segons aquesta característica, es distingeixen detergents no iònics i detergents iònics. Aquests últims, a més, poden dividir-se en catiónics, aniónics i zwitteriònics. La naturalesa del cap polar del detergent influeix en la seva interacció amb la proteïna a solubilitzar, mentre que l'allargada de la corresponent cadena alquílica (zona hidrofòbica) determina dos altres paràmetres també importants: la CMC (concentració miscel·lar crítica) i el nombre d'agregació, els quals es descriuen com la concentració de detergent a la qual es produeix la formació espontània de miscel·les i el número promig de molècules de monòmer de detergent presents en una miscel·la, respectivament.

Ambdós paràmetres són clau en el procés de solubilització d'una proteïna associada a membrana. Quan en una solució la concentració de detergent es troba per sota la seva CMC, les molècules s'organitzen com a monòmers. En el moment en el qual la concentració de detergent iguala la CMC, de forma espontània les molècules passen a organitzar-se en miscel·les, la mida de les quals ve determinada pel nombre d'agregació. Si la concentració de detergent continua augmentant, la quantitat de miscel·les ho fa també mentre que el número de molècules de detergent que existeixen com a monòmers s'estabilitza i iguala aproximadament a la CMC [Wiener, M. C., 2004].

Existeix un elevat consens a l'hora d'afirmar que per tal que un detergent pugui solubilitzar una proteïna associada a membrana, cal que la seva concentració superi àmpliament la seva CMC [Garavito, R. M. i Ferguson-Millers, S., 2001; Wiener, M. C., 2004; Eriksson H. M., *et al*, 2009], en concret es recomana entre 10 i 20 vegades aquest valor. A partir de la solubilització de la proteïna, aquesta passa a formar part dels anomenats complexos proteïna-detergent, els quals consisteixen en miscel·les de detergent que contenen molècules de proteïna i que són en realitat l'entitat que es purifica i si s'escau, es cristal·litza. Aquests complexos conviuen en solució amb monòmers de detergent i miscel·les sense proteïna. A més de la proteïna d'interès, lípids pertanyents a la membrana d'on ha tingut lloc l'extracció de la proteïna poden formar part de les miscel·les i sovint són elements clau per al procés de cristal·lització [Wiener, M. C., 2004; Privé, G. G., 2007].



Existeix la creència errònia que una miscel·la és una estructura esfèrica en la qual les cues hidrofòbiques de les molècules de detergent es col·loquen mirant cap a l'interior, de manera que els caps polars es troben en contacte amb l'entorn aquós. Actualment es coneix que les miscel·les són asimètriques i que tenen superfícies que es podrien descriure com a rugoses, en les quals és possible trobar cues hidrofòbiques que estan en contacte amb l'entorn aquós [Garavito, R. M. i Ferguson-Millers, S., 2001]. Quan aquestes miscel·les acomoden una proteïna associada a membrana, les molècules de detergent envolten les zones hidrofòbiques com si es tractés d'un cinturó (Figura 4.8).

El poder d'extracció o solubilització d'una proteïna associada a membrana per part d'un detergent depèn de paràmetres intrínsecs a la pròpia molècula, com la CMC o la naturalesa del seu cap polar, però també de propietats del medi com ara la força iònica o de la presència d'altres compostos que poden actuar com a co-solubilitzadors, un exemple dels quals seria el glicerol.

4.3.1 Selecció d'un detergent adequat per a l'extracció de GT-MG517

Com ja s'ha comentat, no tots els detergents són vàlids com a agents solubilitzadors i cada proteïna requereix un seguit de proves per tal de trobar aquell que millor l'extregui de la membrana de l'organisme que la produeix. En bibliografia existeix consens a l'hora d'anomenar els detergents més exitosos en el procés de cristallització de proteïnes de membrana. Aquests són: LDAO (*N,N*-dimetildodecilamina-*N*-òxid), OG (*n*-octil- β -D-glucopiranosid), C₈E₄ (octiltetraoxietilè), DM (*n*-decil- β -D-maltopiranosid) i DDM (*n*-dodecil- β -D-maltopiranosid) [Privé, G. G., 2007]. Ara bé, no està tan clar quins són els més recomanables per al procés de solubilització. Els anteriorment citats són utilitzats en alguns casos, però cal sumar-hi també altres detergents com Triton x-100 i CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonij]-1-propansulfonat), els quals són més assequibles econòmicament.

Taula 4.5. Exemples de proteïnes cristallitzades solubilitzades amb Triton x-100 o CHAPS.

Detergent	Proteïna	Detergent usat en la solubilització	Glicerol i/o força iònica	Ref. bibliogràfica
Triton x-100	Receptor GABA (receptor de l'àcid γ -aminobutíric tipus A)	2 %	200 mM KCl	Sato, T. N. i Neale, J. H., 1989
	Receptor de prostaglandina E ₁ i prostaciclina	0.05 %	-	Dutta-Roy, A. K. i Sinha, A. K., 1987
	Receptor de prolactina	1 %	-	Okamura, H., <i>et al</i> , 1989
	Receptor de la transferrina humana	1 %	150 mM NaCl	Turkewitz, A. P., <i>et al</i> , 1988
	Receptor de la insulina humana	2 %	-	Fujita-Yamaguchi, Y. i Harmon, J. T., 1988
CHAPS	Receptor del <i>murine granulocyte colony-stimulating factor</i>	8 mM	150 mM NaCl	Fukunaga, R., <i>et al</i> , 1990
	Receptor de neurotensina	0.6 %	10 % glicerol	Mazella, J., <i>et al</i> , 1989
	Possible receptor de somatostatina	10 mM	20 % glicerol	He, H., <i>et al</i> , 1989
	Receptor d'adenosina A ₁	0.2 %	10 % glicerol 100 mM NaCl	Munshi, R. i Linden, J., 1989
	Receptor de la globulina d'unió d'hormones sexuals	25 – 100 mM	10 % glicerol	Hryb, D. J., <i>et al</i> , 1989

A la Taula 4.5 es presenten alguns exemples de proteïnes de membrana l'estructura tridimensional de les quals ha estat elucidada mitjançant raig-x i en el seu procés d'extracció/solubilització s'ha emprat Triton x-100 o CHAPS. Com es pot veure en alguns dels processos d'extracció es combina l'acció del detergent amb concentracions elevades de glicerol i una determinada força iònica. Cal tenir en consideració, però, que en tots els casos la purificació no té lloc a partir d'una expressió recombinant en un hoste com *E.coli*, sinó que les proteïnes es recuperen a partir de membranes de cèl·lules eucariotes.

Per a glicosiltransferases que sintetitzen glicolípids, més pròximes a GT-MG517, si bé cap d'elles ha estat cristal·litzada fins al moment, també s'han desenvolupat protocols d'extracció. Alguns exemples es resumeixen en la Taula 4.6.

Taula 4.6. Exemples de processos de solubilització de glicosiltransferases que sintetitzen glicolípids.

Proteïna	Detergent usat en la solubilització	Glicerol i/o força iònica	Ref. bibliogràfica
MGlcDG sintasa d' <i>Acholeoplasma laidlawii</i> (producció recombinant en <i>E. coli</i>)	15 mM CHAPS	500 mM NaCl 20 % glicerol	Eriksson, H. M., <i>et al</i> , 2009
DGlcDG sintasa d' <i>Acholeoplasma laidlawii</i> (obtenció a partir del micoplasma)	30 mM CHAPS	20 % glicerol	Vikström, S., <i>et al</i> , 1999
MPN483 de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (obtenció a partir del micoplasma)	30 mM CHAPS	20 % glicerol	Rosén Klement, M., <i>et al</i> , 2007
MPN483 de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (producció recombinant en <i>E.coli</i>)	15 mM CHAPS	500 mM NaCl 20 % glicerol	Rosén Klement, M., <i>et al</i> , 2007
MGDG sintasa de cogombre (producció recombinant en <i>E.coli</i>)	-	-	Shimajima, M., <i>et al</i> , 1997
MGDG sintasa d'espinaç (producció recombinant en <i>E.coli</i>)	6 mM CHAPS	-	Botté, C., <i>et al</i> , 2005
Glicosiltransferasa d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (producció recombinant en <i>E.coli</i>)	-	7 % glicerol	Hölzl, G., <i>et al</i> , 2005a

Com es pot veure en aquests casos el detergent predominant és CHAPS i la presència del glicerol i d'una elevada força iònica es dona en la major part de protocols, si bé també existeixen excepcions com el cas de la MGDG sintasa de cogombre, la qual és extreta de la membrana de cèl·lules d'*E.coli* per un tampó que únicament conté MOPS i DTT, però cap agent solubilitzant [Shimajima, M., *et al*, 1997].

Taula 4.7. Exemples de processos de solubilització de glicosiltransferases.

Proteïna	Detergent usat en la solubilització	Altres components del tampó	Ref. bibliogràfica
β -1,3-glucosiltransferasa (síntesi O-antigen 56 i 152 d' <i>E.coli</i>)	0.1 % triton x-100	PBS	Brockhausen, I., <i>et al</i> , 2008
α -1,6-fucosiltransferasa de cervell porcí	0.5 % triton x-100	20 mM fosfat pH 7, 50 mM KCl, 5 mM EDTA	Uozumi, N., <i>et al</i> , 1996
Heptosiltransferasa I (síntesi del LPS d' <i>E.coli</i>)	1 % triton x-100	50 mM HEPES pH 7.5	Kadmas, J. L. i Raetz, C., 1998
α -galactosiltransferasa de <i>Trypanosoma brucei</i>	2 % triton x-100	25 mM PIPES pH 7, 5 mM MnCl ₂ , 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT	Pingel, S., <i>et al</i> , 1999
Manosiltransferasa (síntesi LPS de <i>R. leguminosarum</i>)	1 % triton x-100	50 mM HEPES pH 7.5	Kanipes, M. I., <i>et al</i> , 2003

Els processos de solubilització d'altres glicosiltransferases no relacionades amb la síntesi de glicolípidis també inclouen detergents, tal com es mostra en la Taula 4.7, però en aquest cas predominen els enzims solubilitzats amb Triton x-100, sense glicerol i amb forces iòniques relativament baixes. Cal dir que no per totes les proteïnes llistades s'ha demostrat la seva unió a la membrana plasmàtica, fet que explicaria la seva relativa facilitat d'extracció.

Per tal d'establir la composició d'un tampó que sigui capaç d'extreure GT-MG517 de les membranes de les cèl·lules d'*E.coli* que s'utilitzen com a organisme d'expressió per a la proteïna, es proven 4 tampons d'extracció diferents, la composició dels quals es detalla a la Taula 4.8.

Taula 4.8. Composició dels diferents tampons d'extracció provats per a GT-MG517.

Tampó	Composició
A	20 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 0.5% triton x-100
B	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 22 mM CHAPS, 10% glicerol
C	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20% glicerol
D	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl

Els tampons A i B combinen un detergent, Triton x-100 en el tampó A i CHAPS en el tampó B, glicerol i una elevada força iònica per tal de solubilitzar GT-MG517. D'altra banda, el tampó C únicament disposa de glicerol (tampó d'extracció del protocol anterior a la coexpressió amb xaperones) i el tampó D encara és més reduït i només compta amb una elevada força iònica.

La tria del millor tampó de solubilització per a GT-MG517 es realitza mitjançant la comparació dels valors d'activitat específica que proporcionen els extractes proteics obtinguts amb cadascun dels tampons. Els esmentats valors d'activitat s'obtenen a partir de l'assaig radiomètric desenvolupat en la present tesi i descrit àmpliament en el Capítol 5 "*Estudi cinètic de l'activitat enzimàtica de GT-MG517*". Per a cada tampó, l'obtenció de l'extracte es fa a partir del protocol descrit en el punt 9.1.2 de la *Part Experimental*.

A la Taula 4.9 es presenten els resultats obtinguts.

Taula 4.9. Comparativa d'activitat específica per als diferents tampons d'extracció.

Tampó	[prot tot] _{BCA} (mg/mL)	a _{esp} -UDP-Gal (U/mg _{prot tot})	U _{extracte}	U _{extracte} relatives
A	6.3	0.17	2.68	64
B	7.0	0.24	4.20	100
C	4.1	0.08	0.49	12
D	2.9	0.09	0.39	9

Volum cultiu: 50 mL; volum extracte: 2.5 mL; condicions assaig d'activitat: 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG, 12.5 mM DOPG, 1 mM UDP-¹⁴C-Gal, 3 - 4 µg proteïna total i T=35 °C.

La concentració de proteïna total present en cada extracte proporciona una idea sobre el poder extractor general del tampó, ja que en el valor que s'obté es troben incloses totes les proteïnes d'*E.coli* solubilitzades, a més de GT-MG517. L'activitat específica permet quantificar la presència de la glicosiltransferasa en els extractes, ja que l'activitat mesurada prové únicament de la seva acció. Finalment, la combinació dels dos paràmetres es materialitza en les unitats enzimàtiques totals que hi ha en l'extracte. És aquest valor el que permet establir quin és el millor

tampó per a solubilitzar GT-MG517, ja que permet avaluar conjuntament el tampó que més proteïnes extreu i que d'aquestes, la predominant sigui la d'interès.

Així doncs, és clar que la combinació de força iònica, glicerol i un detergent és bàsica per a l'extracció de GT-MG517. Pel que fa al millor detergent, el tampó amb CHAPS aconsegueix millors resultats, tot i que no es pot descartar el Triton x-100. Per tant, es decideix desenvolupar protocols de purificació amb ambdós detergents per separat i al final avaluar quin permet la millor purificació de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium*.

4.4 Purificació de GT-MG517 mitjançant la seva solubilització amb Triton x-100

En aquest punt es detallen els experiments realitzats per tal d'aconseguir la purificació de la glicosiltransferasa GT-MG517 de *Mycoplasma genitalium* emprant tampons d'extracció amb base el detergent Triton x-100.

4.4.1 Selecció del millor tampó de solubilització amb base Triton x-100

Si bé s'ha establert anteriorment que un tampó que combina Triton x-100 i glicerol és capaç de solubilitzar GT-MG517 i mantenir-la funcional en solució, es realitza una tria entre diferents tampons que contenen combinacions d'ambdós compostos per tal de comprovar quin d'ells extreu una quantitat major de glicosiltransferasa. La composició de cadascun d'aquests tampons es recull a la Taula 4.10.

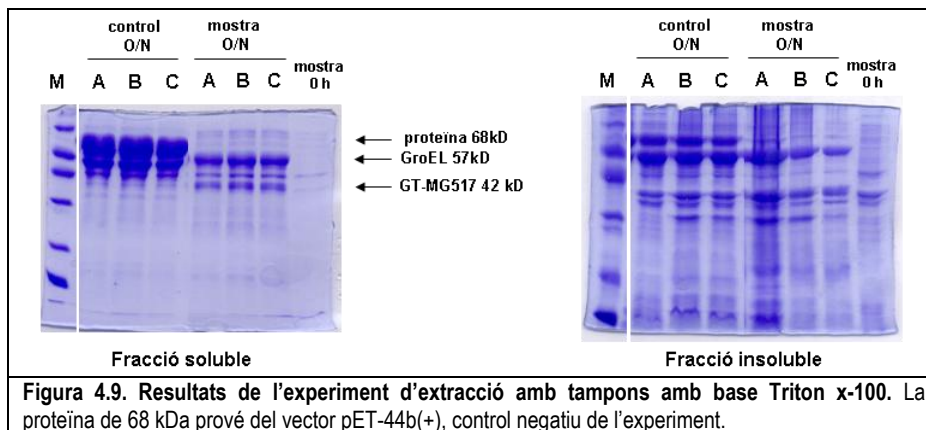
Taula 4.10. Composició dels diferents tampons d'extracció amb base Triton x-100 provats per a GT-MG517.

Tampó	Composició
A	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 0.5 % w/v Triton, 10% glicerol
B	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 0.5 % w/v Triton
C	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 1 % w/v Triton

La capacitat extractora de cada tampó s'avalua a partir de la quantitat de proteïna GT-MG517 soluble que es recupera del *pellet* cel·lular provinent d'un cultiu de 10 mL de cèl·lules *d'E.coli* BL21 DE3 cotransformades amb els plasmidis pET517HisC i pGro7 i induïdes segons el protocol 9.1.2 de la *Part Experimental*. En el mateix protocol s'explica el procediment d'extracció.

Per a cada tampó, les fraccions soluble i insoluble es visualitzen en un gel de SDS-PAGE (Figura 4.9). Com a control negatiu es treballa amb cèl·lules d'*E.coli* transformades igualment amb pGro7 i amb pET-44b(+), el vector sense el gen *mg517*.

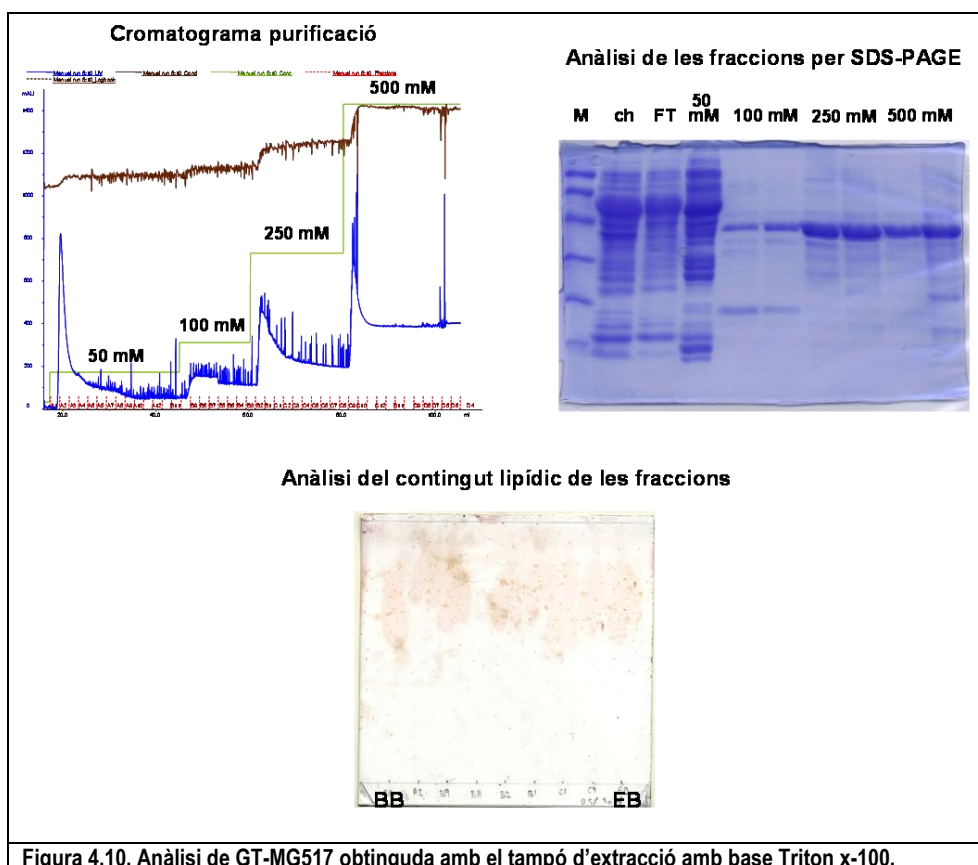
Segons la intensitat de les bandes de GT-MG517 que s'aprecien en el gel de SDS-PAGE, l'extracció de la proteïna és equivalent en els tres tampons provats, si bé podria intuir-se una major quantitat de glicosiltransferasa en el tampó B. És per aquest motiu que s'escull com a tampó inicial per a les proves d'expressió i purificació a escala d'un litre de cultiu.



4.4.2 Purificació de GT-MG517 solubilitzada amb Triton x-100 mitjançant cromatografia d'afinitat

La purificació de GT-MG517 té lloc inicialment a partir d'un litre de cultiu de cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 cotransformades amb pET517HisC i pGro7 crescut i induït segons el protocol descrit en el punt 9.1.3 de la *Part Experimental*. En el mateix protocol es descriu la solubilització de la proteïna amb el tampó de composició 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl i 0.5 % tritó escollit en l'apartat anterior.

L'aïllament de GT-MG517 té lloc per cromatografia d'afinitat per Ni, tal com es detalla en el protocol 9.2 de la *Part Experimental*. El tampó d'elució consta de 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % tritó i 500 mM imidazole i l'elució es realitza a partir de graons de diferents concentracions d'imidazole (Figura 4.10).



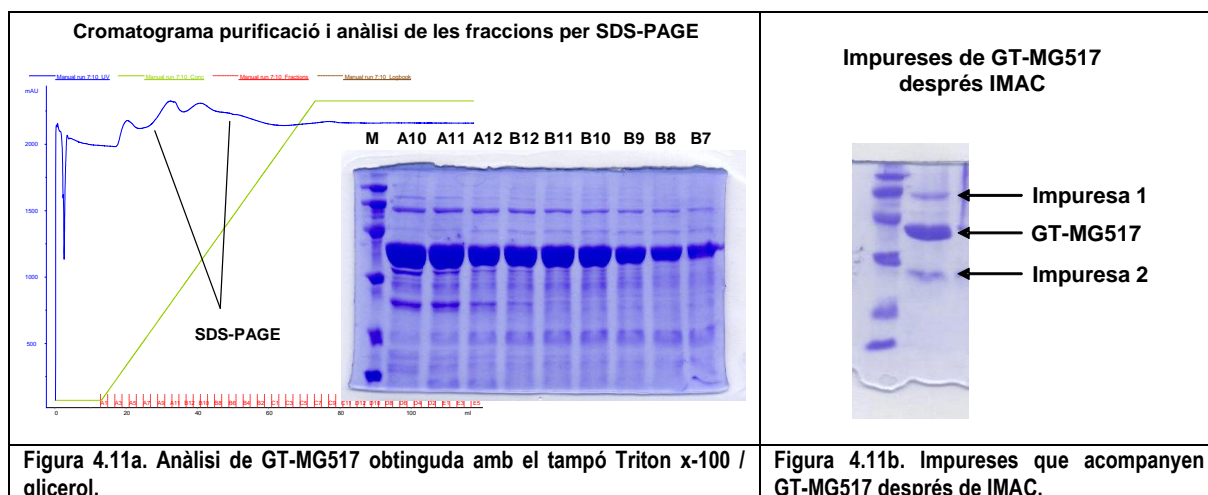
D'una banda s'observa la major quantitat de GT-MG517 que es recupera en el procés, en comparació amb la que s'obtenia en el protocol antic del grup, el qual no treballava ni amb xaperones ni amb cap detergent en l'extracció (veure Figura 4.2). De l'altra, no es detecta la presència de lípids que acompanyin la proteïna després de la purificació. En aquest sentit, es pot afirmar que el Triton x-100 és capaç de desplaçar els lípids de membrana que puguin trobar-se associats a GT-MG517. No obstant això, l'elució de la proteïna a diferents concentracions d'imidazole fa pensar que existeixen diferents poblacions d'aquesta, amb diferents afinitats per la columna de Ni.

Les fraccions eluïdes amb 250 i 500 mM imidazole es combinen i se sotmeten a diàlisi contra un tampó de composició 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl i 0.5 % Triton x-100. La proteïna així dialitzada precipita, segurament degut a la necessitat de substituir la força iònica de l'imidazole eliminat per algun altre compost que mantingui GT-MG517 en solució.

Per aquest motiu es decideix incloure una certa quantitat de glicerol en el tampó de solubilització. D'altra banda, i amb l'objectiu de disminuir la quantitat de proteïnes que s'uneixen inespecíficament a la columna de Ni^{2+} , s'inclou també una certa quantitat d'imidazole a l'esmentat tampó, el qual queda amb una composició final de 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100, 5 % glicerol i 20 mM imidazole.

Un segon canvi que s'introdueix, a part dels nous components del tampó, és en el procediment d'elució, el qual es realitza seguint un gradient de 0 a 500 mM d'imidazole en substitució dels graons anteriors, amb l'objectiu de millorar la puresa de la proteïna aïllada.

A la Figura 4.11a es presenta l'anàlisi de GT-MG517 solubilitzada amb el tampó 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100, 5 % glicerol i 20 mM imidazole i eluïda de la columna d'afinitat mitjançant el gradient esmentat abans.



S'observa com, tot i l'aplicació del gradient, no s'aconsegueix recuperar la glicosiltransferasa sense impureses. Les fraccions que es visualitzen en el gel de la Figura 4.11a es combinen i es dialitzen contra un tampó de contingut 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100 i 5 % glicerol. En aquest cas la proteïna es manté en solució i la seva quantificació a partir del mètode de Lowry (Protocol 9.6.1 de la *Part Experimental*) proporciona una

concentració pel millor batch de 1.4 mg/mL, la qual implica un rendiment del cultiu de 40 mg de GT-MG517 per litre de cultiu. La concentració de l'esmentada proteïna mitjançant un centricon (Centriprep 30 kD de *cut off* de Millipore) no permet superar, però, la concentració de 2 mg/mL, límit en el qual la proteïna precipita.

4.4.2.1 Identificació per MALDI de les impureses que coelueixen amb GT-MG517

A la Figura 4.11b es presenta la proteïna resultant del procés de concentració, acompanyada per dues impureses, les quals s'extreuen del gel de SDS-PAGE i se sotmeten a digestió triptica per tal d'analitzar-ne els fragments peptídics per MALDI-TOF i establir-ne la identitat. Mitjançant la comparació de la intensitat de les bandes de cadascuna de les proteïnes en l'esmentat gel, s'estableix que la Impuresa 1 representa aproximadament un 60 % respecte la quantitat de GT-MG517 present a la mostra, mentre que la Impuresa 2 en representa aproximadament un 40 %.

Els resultats de l'anàlisi per MALDI-TOF de les impureses que co-purifiquen amb GT-MG517 revelen que l'anomenada Impuresa 1 en la Figura 4.11b es tracta de la xaperona d'*E.coli* GroEL, mentre que la descrita com a Impuresa 2 és identificada com una peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (veure Figura 4.12).

Identificació GT-MG517 – 41946.6 D

```

1   MDKLVSVLP CYKSKPFLKR FFNSLLKQDL NQAKIIFFND NVADETYEVL
51  QKFKEHNNL AIEVYCDKQN EGIGKVRDKL VNLVTTPYFY FIDPDDCFNN
101 KNVIKEIVES IKKEDFDLGV LKSMVYLCFL KHDFIKFLP LKGIFQGRVK
151 LINNNNVNKL NYIKNNDQYI WNIVINTDFF RKLNLTFESR LFEDIPIWYP
201 MFFSSQKIVF IDVIGTNYFI RNDSLSTTIS APRYLNLIQC YEKLYVNLSQ
251 NGSLASFIDP NHKIEARFWR RQMFVWFALF SFEYFKKNFS ESKKILEKLF
301 VFLEKNGVYE RVFQTKNQGI YYIWVQRLKY FKHVLESKSD N
    
```

en vermell: pèptids identificats (21 % de la seqüència)

Identificació impuresa 1 – 54415 D - GroEL

```

1   VKFGNDAGVK MLRGVNVLD AVKVTLGPKG RNVVLDKSFG APTITKDGVS
51  VAREIELEDK FENMGAQMVK EVASKANDAA GDGTTTATVL AQAIITEGLK
101 AVAAGNPNMD LKRGIDKAVT VAVEELKALS VPCSDSKAIA QVGTISANSD
151 ETVGKLIAEA MDKVGKEGVI TVEDGTGLQD ELDVVEGMQF DRGYLSPYFI
201 NKPETGAVEL ESPFILLADK KISNIREMLP VLEAVAKAGK PLLIIAEDVE
251 GEALATAVVN TMRGIVKVAA VKAPGFGDRR KAMLQDIATL TGGTVISEEI
301 GMELEKATLE DLGQAKRVVI NKDTTTIIDG VGEEAAIQGR VAQIRQQIEE
351 ATSDYDREKL QERVAKLAGG VAVIKVGAAT EVEMKEKKAR VEDALHATRA
401 AVEEGVVAGG GVALIRVASK LADLRGQNED QNVGIKVALR AMEAPLRQIV
451 LNCGEPSVV ANTVKGGDGN YGYNAATEEY GNMIDMGILD PTKVTRSALQ
501 YAASVAGLMI TTECMVTD
    
```

en vermell: pèptids identificats (40 % de la seqüència)

Identificació impuresa 2 – 20840 D – peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa

```

1   MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE
51  GHEVGDKFDV AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLAET
101 DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG
151 HVHGAHDHHH DHDHDGCCGG HGHDHGHEHG GEGCCGGKGN GCGCH
    
```

en vermell: pèptids identificats (50 % de la seqüència)

en blau: zona rica en histidines

Figura 4.12. Identificació per digestió triptica / MALDI-TOF de les impureses que co-purifiquen amb GT-MG517.

La co-elució de GroEL amb la proteïna d'interès es troba descrita en bibliografia per a processos d'expressió i purificació en els quals, com en el cas del present treball, s'empra la xaperona per tal de facilitar el plegament de la proteïna a recuperar [Rohman, M. i Harrison-Lavoie, K., 2000; Barroso, J., *et al*, 2003; Lee, H., *et al*, 2004; Venkatesh, B., *et al*, 2004; Farkas, T., *et al*, 2006; Wang, J., *et al*, 2006]. Tot i que en alguns casos l'eliminació de la xaperona no és possible perquè es troba formant algun tipus de complex irreversible amb la proteïna d'interès, en d'altres la seva separació és possible mitjançant una cromatografia de bescanvi iònic.

Ara bé, la forma més habitual d'eliminació de GroEL és a partir d'un protocol que combina ATP i un extracte de proteïnes bacterianes desnaturalitzades. El fonament en el qual es basa l'esmentat procediment és que en la funció natural de GroEL d'assistència al plegament de cadenes polipeptídiques, la unió amb aquestes es troba regulada per ATP. De fet, la unió del nucleòtid a la xaperona disminueix la seva afinitat per la proteïna que s'està plegant. Aquesta pèrdua d'afinitat encara es fa més pronunciada davant la presència de GroES, o en el seu defecte, d'altres proteïnes bacterianes desnaturalitzades [Rohman, M. i Harrison-Lavoie, K., 2000]. Així doncs, si la presència de GroEL impurificant la mostra final de GT-MG517 és deguda a l'existència encara d'afinitat entre la xaperona i la glicosiltransferasa, el tractament amb ATP hauria de facilitar l'eliminació de GroEL. No obstant, l'aplicació del protocol descrit en bibliografia no dona resultats satisfactoris, indicant que la presència de la xaperona no s'explica per una interacció amb GT-MG517 derivada del procés de plegament.

D'altra banda, la presència de la segona de les impureses, la peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa, en la mostra final de GT-MG517 té la seva explicació en la zona extremadament rica en His que es troba a la part C-terminal de la proteïna (marcada en blau a la Figura 4.12), la qual li provoca un comportament semblant al d'una proteïna amb una cua d'His, com és el cas de la glicosiltransferasa d'interès.

En un intent de purificar les impureses que acompanyen a GT-MG517 després de la cromatografia d'afinitat, es pensa en una cromatografia de bescanvi iònic, ja que per a la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* es prediu un punt isoelèctric (pI) anormalment elevat de 9.2 i les dues impureses tenen pI al voltant de 5. Tot i aquesta diferència no s'aconsegueix l'esperada separació, fet que permet formular la hipòtesi que les tres proteïnes formen un complex juntament amb el detergent que les acompanya i que evita la seva separació.

Cal dir, però, que ja que la quantitat de GT-MG517 present en la mostra és força superior en comparació amb la de les impureses, és més probable la formació de complexos entre diverses molècules de glicosiltransferasa que entre aquesta i alguna de les proteïnes no desitjades. Tanmateix, aquesta opció no pot descartar-se.

4.4.3 Aplicació de la cromatografia de gel-filtració a la purificació de GT-MG517

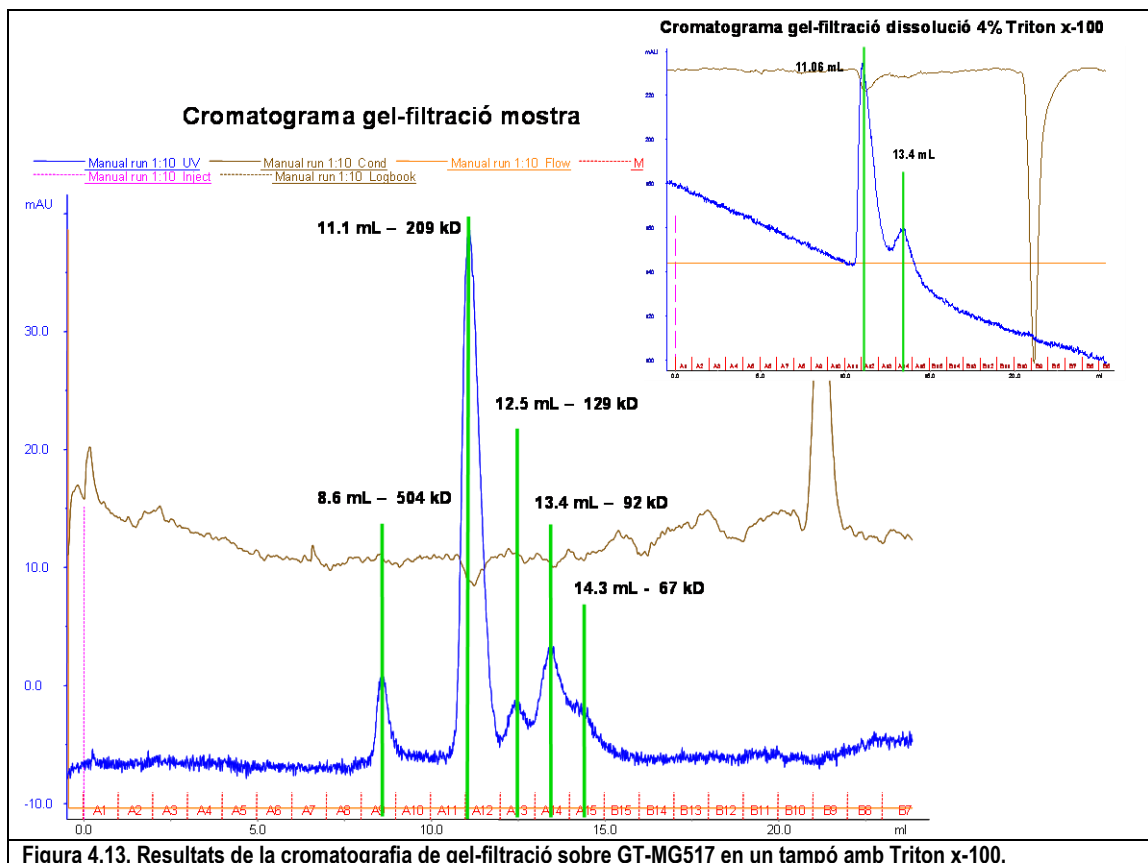
Una tècnica molt emprada per a la visualització dels complexos proteïna-detergent que es formen en processos d'extracció d'una proteïna de membrana o associada a ella és la cromatografia de gel-filtració o d'exclusió molecular [Wiener, M. C., 2004; Eriksson, H. M., *et al*, 2009], la qual permet establir si l'esmentada proteïna es troba com a monòmer o forma estructures supramoleculares amb d'altres proteïnes mitjançant l'avaluació del seu pes molecular en solució.

Amb l'objectiu de conèixer si GT-MG517 forma agregats de diverses unitats de proteïna o complexos amb les seves dues impureses o si, per contra, les tres proteïnes poden separar-se en funció de la seva mida, es decideix aplicar la cromatografia de gel-filtració a les mostres de glicosiltransferasa que s'obtenen després de la cromatografia d'afinitat explicada en el punt anterior.

4.4.3.1 Cromatografia de gel-filtració amb tampons amb base Triton x-100

Per a la cromatografia de gel-filtració s'utilitza una columna Superdex™ 200 10/300 GL de GE Healthcare ja pre-empaquetada, amb capacitat de separació de 10 a 600 kD i un flux de 0.5 mL/min per assegurar una bona resolució. Les mostres amb les quals es treballa tenen un perfil proteic com el de la Figura 4.11b i es troben en un tampó de composició 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100 i 5 % glicerol. Inicialment aquest mateix tampó és el que s'empra per eluir la columna de gel-filtració (Protocol 9.3 de la *Part Experimental*).

A la Figura 4.13 es presenta el cromatograma resultant. El pes molecular que s'associa a cadascun dels pics que es distingeixen resulta de la calibració feta de la columna amb proteïnes de pes molecular conegut (BSA i DNasa I) en el mateix tampó d'elució. Tal com s'aprecia, dos dels pics són directament adjudicables al Triton x-100, ja que l'elució per la mateixa columna d'una mostra d'una solució de composició 4 % en el detergent genera els mateixos pics (cromatograma petit Figura 4.13). Sembla, doncs, que el Triton x-100 no és un detergent adequat per a cromatografies de gel-filtració, ja que ell sol forma estructures supramoleculares, probablement agregats de miscel·les, que són susceptibles de ser separats per la columna.



A part d'això, els resultats confirmen la hipòtesi de l'existència d'agregats de GT-MG517, ja que no s'observa cap pic de pes molecular associable al monòmer de la glicosiltransferasa (42 kD). En canvi, el pic de 129 kD podria correspondre a un hipotètic trimer de la proteïna.

És necessari un canvi de detergent que permeti substituir el Triton x-100 per un altre compost que faciliti l'aïllament de la glicosiltransferasa com a monòmer. En aquest cas, s'escullen detergents de tipus alquil glicòsid, ja que són els que tenen una taxa d'èxit superior en els protocols de cristal·lització, degut a la seva capacitat d'obtenir solucions homogènies de complexos proteïna-detergent cristal·litzables.

4.4.3.2 Cromatografia de gel-filtració amb detergents del tipus alquil glicòsid

Els detergents escollits per a realitzar les proves de cromatografia de gel-filtració són: OG (*n*-octil- β -D-glucopiranosid), DM (*n*-decil- β -D-maltopiranosid), DDM (*n*-dodecil- β -D-maltopiranosid) i C₈E₄ (octiltetraoxietil·lè). Els tres primers són del tipus alquil glicòsid, mentre que l'últim d'ells forma part de la família dels polioxietil·lens.

Pel que fa a la concentració de cadascun d'ells es decideix treballar amb una equivalent a la meitat de la CMC del detergent. Cal tenir en compte que la cromatografia de gel-filtració dilueix àmpliament les mostres. Per aquest motiu un pas posterior obligat gairebé sempre és una concentració, la qual a més de concentrar la proteïna d'interès, concentra el propi detergent. Una concentració massa elevada d'aquest compost podria portar a la desnaturalització de la proteïna, amb la seva conseqüent precipitació [Wiener, M. C., 2004]. Per aquest motiu, és convenient iniciar el procés de separació amb la quantitat més petita possible de detergent que mantingui soluble GT-MG517. Així doncs, la composició final dels tampons que s'usaran és la que es recull a la Taula 4.11.

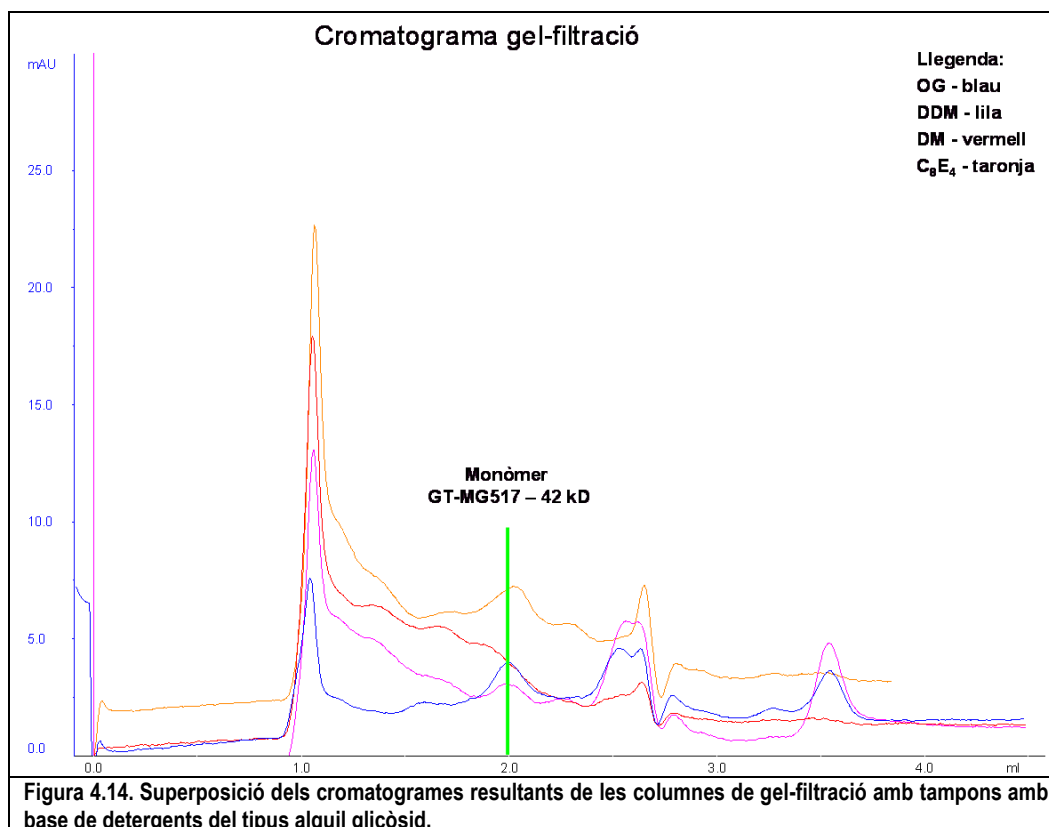
Taula 4.11. Composició dels diferents tampons per cromatografia de gel-filtració amb base detergents de tipus alquil glucòsid.

Tampó	Composició
OG	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 5 % glicerol, 12.5 mM OG
DM	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 5 % glicerol, 0.8 mM DM
DDM	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 5 % glicerol, 0.075 mM DDM
C ₈ E ₄	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 5 % glicerol, 4 mM C₈E₄

El primer pas necessari és l'eliminació del Triton x-100 de les mostres de GT-MG517, les quals s'obtenen a partir del procediment descrit fins al moment i consistent en: extracció amb el tampó 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100, 5 % glicerol i 20 mM imidazole, purificació per cromatografia d'afinitat amb un gradient d'imidazole i diàlisi final contra un tampó de composició 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100 i 5 % glicerol.

El Triton x-100 forma miscel·les molt grans, ja que té un valor de CMC molt baix (veure Taula 4.4). Per aquest motiu la seva eliminació mitjançant diàlisi no és factible. Així doncs, es decideix realitzar el canvi de detergent a partir de la immobilització de GT-MG517 de nou a una columna d'afinitat i portant a terme la seva elució ja amb el nou tampó, el qual porta en cada cas el detergent escollit (Protocol 9.5 de la *Part Experimental*). El pas final que produeix les mostres que es carregaran a la columna de gel-filtració és una diàlisi per tal d'eliminar l'imidazole contra els tampons llistats en la Taula 4.11. Les concentracions de GT-MG517 que es recuperen en cada cas es troben entre 1.3 i 1.6 mg/mL.

La columna de gel-filtració que s'emptra en aquest cas també és una Superdex™ 200 de GE Healthcare pre-empaquetada, però del model PC 3.2/30, d'un volum de columna molt inferior que l'utilitzada amb les mostres amb Triton x-100, fet que permet la realització d'injeccions d'un volum de 10 µL de mostra. S'ha usat un flux de 0.3 mL/min, el qual s'espera que pugui separar GT-MG517 de les impureses que l'acompanyen (Protocol 9.3 de la *Part Experimental*).



A la Figura 4.14 es presenta la superposició dels cromatogrames obtinguts per a cadascuna de les columnes de gel-filtració realitzades. S'observa en tots els casos la presència d'agregats solubles de pes molecular molt gran formats per GT-MG517 i les seves impureses. Únicament amb dos dels detergents provats, OG i C₈E₄, és possible distingir monòmers de la glicosiltransferasa, tal com es marca amb una línia en l'esmentada Figura 4.14. No obstant, es considera que OG és el detergent més adequat, ja que en comparació amb C₈E₄, redueix la presència d'agregats d'alt pes molecular. Per tal, però, d'augmentar la proporció de monòmers de GT-MG517 és necessari augmentar la concentració de detergent present en el tampó.

A tal efecte, es preparen mostres de GT-MG517 amb diferents concentracions del detergent OG superiors en tots els casos a la del tampó provat en la cromatografia de gel-filtració anterior (12.5 mM). La CMC per a OG es troba entre 20 – 25 mM (veure Taula 4.4). Ja que és necessària una concentració superior a 12.5 mM, però no es coneix quin efecte tindrà augmentar aquest valor per sobre de la CMC, es preparen quatre mostres diferents amb les següents concentracions de OG: 17 mM (valor inferior a CMC), 20 mM (valor equivalent a la CMC), 30 mM i 50 mM (ambdós valors superiors a CMC).

El procediment per a l'obtenció de les mostres és el mateix que el seguit anteriorment per canviar el tampó de Triton x-100 en el qual es troba GT-MG517 al final de la cromatografia d'afinitat; és a dir, nova immobilització a la resina de Ni^{2+} de la proteïna, rentat del Triton x-100 amb un tampó sense detergent (50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl i 5 % glicerol) i elució amb el tampó que ja conté el detergent OG amb la concentració desitjada, a més d'aquests altres components: 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 5 % glicerol i 500 mM imidazole. El resultat en tots els casos ha portat a la precipitació de GT-MG517, potser deguda a una concentració massa elevada de detergent, la qual ha causat el desplegament de l'estructura proteica i la conseqüent insolubilització. Per tant, no ha estat possible la realització de noves cromatografies de gel-filtració amb els tampons en base al detergent OG, el qual en un principi semblava la millor opció per a la disminució de l'estat d'agregació de GT-MG517 en solució.

4.4.3.3 Cromatografia de gel-filtració de GT-MG517 sense detergents

L'impossibilitat d'obtenir monòmers de GT-MG517 mitjançant cromatografia de gel-filtració quan la proteïna es troba en un tampó amb un detergent, permet proposar la hipòtesi que aquest fet és degut precisament a la presència del detergent, el qual estabilitza agregats solubles de la glicosiltransferasa, els quals poden incloure també GroEL i la peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa. Així doncs, es podria pensar en una cromatografia de gel-filtració amb un tampó sense detergent, el qual però hauria de tenir algun component que mantingués GT-MG517 en solució, per exemple glicerol.

Ja que la capacitat extractora del detergent no pot obviar-se, es decideix mantenir-lo en el tampó de solubilització, el qual posseeix la ja coneguda composició de 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100, 5 % glicerol i 20 mM imidazole. Ara bé, l'estratègia que se segueix per a l'eliminació posterior del Triton x-100 és la mateixa que la portada a terme en el punt anterior per introduir els detergents de tipus alquil glicòsid, és a dir, la immobilització de GT-MG517 a la columna d'afinitat i aprofitar aquesta immobilització per, primer, eliminar el Triton x-100 amb un tampó de rentat (50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl i 20 % glicerol) i, després, procedir a l'elució de la proteïna amb un tampó sense el detergent i amb una concentració elevada de glicerol (50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 20 % glicerol i 500 mM imidazole) mitjançant un gradient d'imidazole.

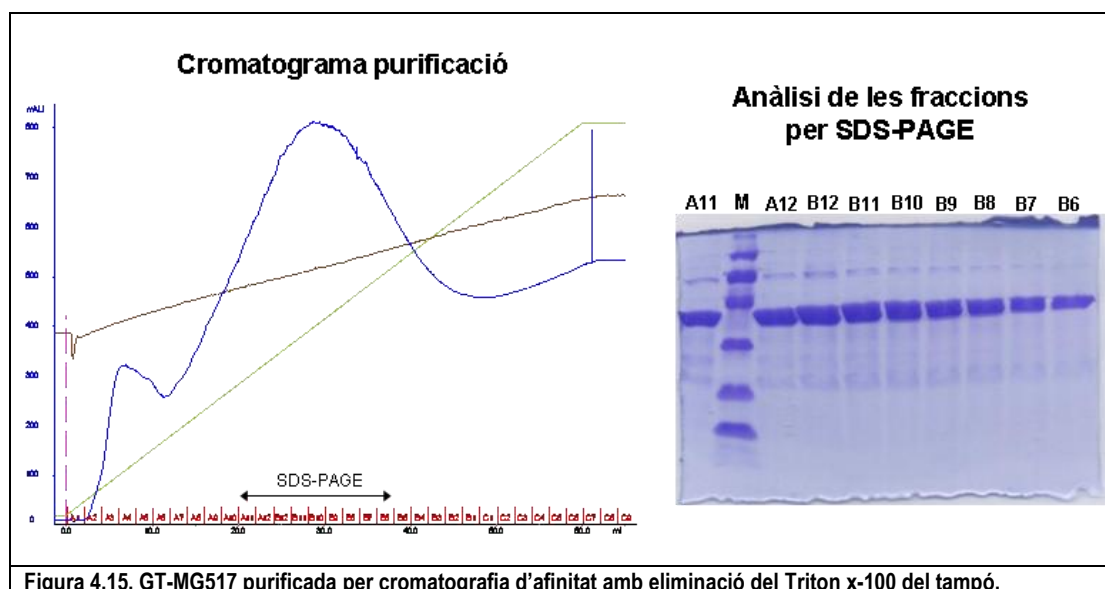
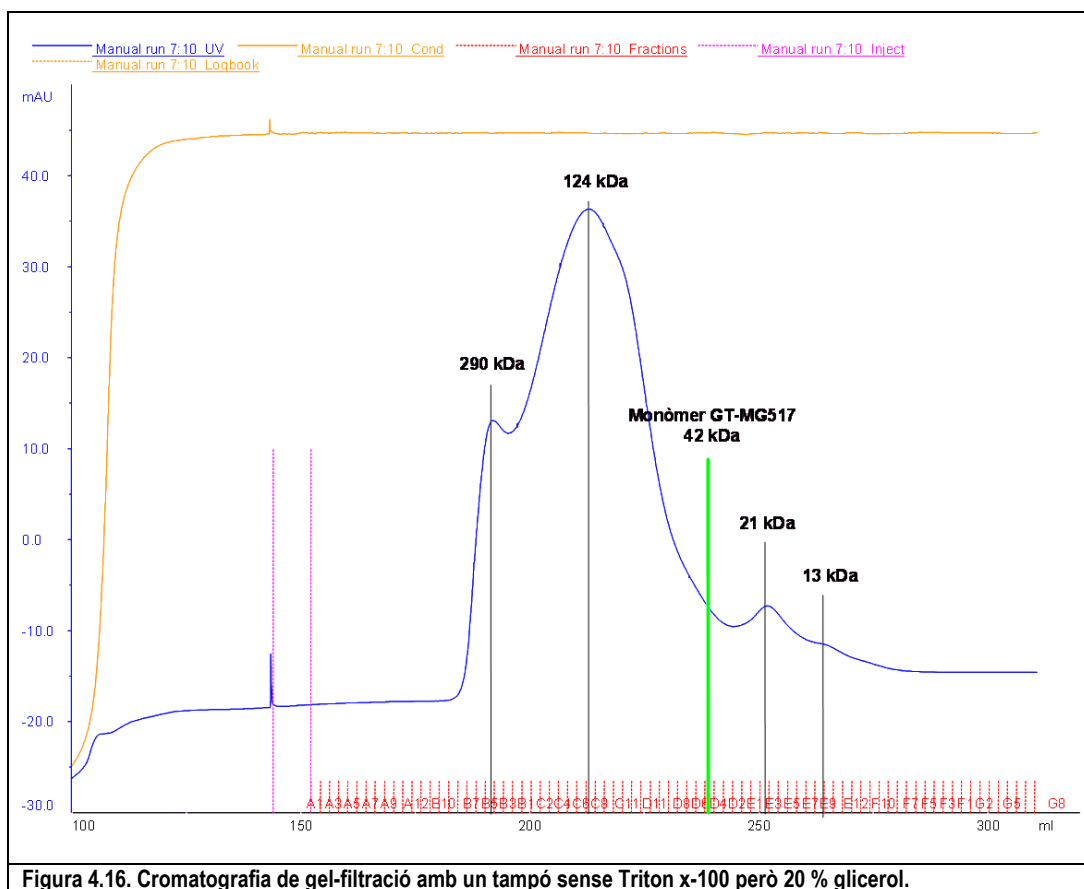


Figura 4.15. GT-MG517 purificada per cromatografia d'afinitat amb eliminació del Triton x-100 del tampó.

A la Figura 4.15 es presenta el resultat de la cromatografia d'afinitat realitzada com s'acaba de descriure. Pot apreciar-se una notable disminució del nombre d'impureses minoritàries que acompanyen la glicosiltransferasa d'interès (en comparació amb el gel de la Figura 4.11a), segurament arrossegades pel tampó de rentat en el procés d'eliminació del Triton x-100, si bé la presència de GroEL encara és fàcilment identificable.

La proteïna obtinguda segons aquest procediment es dialitza contra el tampó 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl i 20 % glicerol, que és també el tampó amb el qual s'elueix la columna de gel-filtració. Aquesta es realitza amb una columna XK 16 Superdex™ 200 de GE Healthcare però empaquetada en el laboratori, tot i que amb el mateix marge de separació de 10 a 600 kDa que la descrita en el punt 4.4.3.1. El flux emprat en l'elució ha estat de 0.3 mL/min (Protocol 9.3 de la *Part Experimental*).

A la Figura 4.16 es recull el cromatograma resultant de la columna de gel-filtració. Pot apreciar-se que l'eliminació del detergent no provoca millores en l'estat d'agregació de GT-MG517 en solució, ja que cap dels pics que apareix al cromatograma correspon al pes del monòmer de la glicosiltransferasa. Al contrari, la intensitat del pic que correspondria a un trimer de GT-MG517 (124 kDa) presenta a aquesta espècie com la majoritària de la mostra analitzada. A més, la visualització de les diferents fraccions recollides al llarg de l'elució en un gel de SDS-PAGE permet afirmar que, si bé la columna elimina la peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (pic de 21 kDa), no és capaç de separar la xaperona GroEL de GT-MG517.



Sembla, doncs, que es confirma l'existència d'agregats de GT-MG517 amb ella mateixa i amb GroEL que són altament estables en solució i que l'eliminació del detergent Triton x-100 no fa desaparèixer. Es pensa en un canvi de detergent des del procés inicial de solubilització, ja que d'aquesta manera s'evitaria d'entrada la formació dels esmentats agregats.

4.5 Purificació de GT-MG517 mitjançant la seva solubilització amb CHAPS

En aquest punt es detallen els experiments realitzats per tal d'aconseguir la purificació de la glicosiltransferasa GT-MG517 de *Mycoplasma genitalium* emprant tampons d'extracció amb base el detergent CHAPS.

4.5.1 Selecció del millor tampó de solubilització amb base CHAPS

Anteriorment s'ha presentat un tampó amb CHAPS i glicerol com aquell que era capaç de solubilitzar més quantitat de GT-MG517 de les membranes d'*E.coli* d'entre tampons de composició diversa (veure Taula 4.8). Amb l'objectiu d'establir les millors condicions per aquesta extracció, es realitza l'anàlisi de l'activitat específica de diversos extractes proteics que contenen GT-MG517 obtinguts a partir de tampons amb base CHAPS però amb components i concentracions d'aquests diverses, les quals es detallen a la Taula 4.12.

Taula 4.12. Composició dels diferents tampons amb base CHAPS provats per a GT-MG517.

Composició				
Nom	Tampó	NaCl	CHAPS	glicerol
1	20 mM HEPES pH 8	100 mM	10 mM	10 %
2	20 mM HEPES pH 8	100 mM	20 mM	10 %
3	20 mM HEPES pH 8	100 mM	10 mM	20 %
4	20 mM HEPES pH 8	100 mM	20 mM	20 %
5	20 mM HEPES pH 8	500 mM	10 mM	10 %
6	20 mM HEPES pH 8	500 mM	20 mM	10 %
7	20 mM HEPES pH 8	500 mM	10 mM	20 %
8	20 mM HEPES pH 8	500 mM	20 mM	20 %
9	20 mM HEPES pH 8	500 mM	20 mM	-
10	20 mM HEPES pH 8	-	20 mM	20 %

S'observa com per a cada component s'han establert dos nivells de concentració, alta i baixa i a part, s'han afegit dues condicions més que han de servir en un cas (Tampó 9) per analitzar el paper del glicerol i en l'altre, per fer el mateix amb el paper del NaCl (Tampó 10) independentment dels altres components.

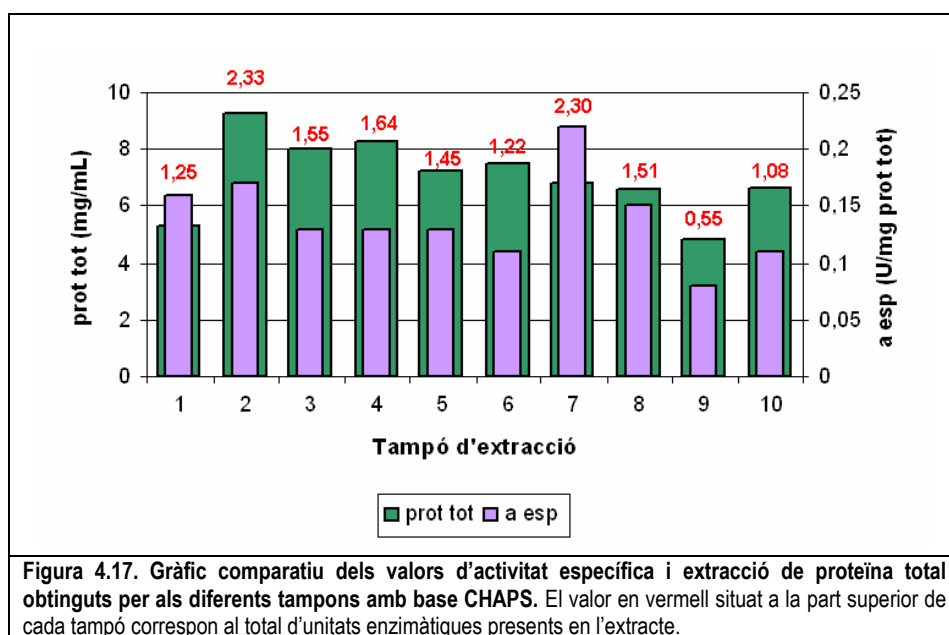
Els extractes proteics s'obtenen a partir de cultius de cèl·lules d'*E.coli* cotransformades amb pET517HisC i pGro7. El creixement i inducció de l'expressió de GT-MG517 té lloc segons el protocol 9.1.2 de la *Part Experimental*, en el qual també es descriu el procés d'extracció. Els valors d'activitat específica de cada extracte proteic s'obtenen a partir de l'aplicació de l'assaig radiomètric desenvolupat en la present tesi i explicat àmpliament en el Capítol 5 "Estudi cinètic de l'activitat enzimàtica de GT-MG517".

Els resultats obtinguts per a cadascun dels tampons es recullen a la Taula 4.13 i al gràfic de la Figura 4.17. Com ja s'ha comentat anteriorment, el poder solubilitzador general del tampó s'avalua amb el paràmetre de la concentració de proteïna total, mentre que la capacitat d'extreure preferentment GT-MG517 es quantifica amb el valor de l'activitat específica. Ja que el millor tampó és aquell que combina els dos factors anteriors, el paràmetre al qual cal prestar atenció és les unitats enzimàtiques totals presents a l'extracte i és en base a aquest que es realitza l'anàlisi següent.

Taula 4.13. Comparativa d'activitat específica per als diferents tampons d'extracció amb base CHAPS.

Tampó	[prot tot] _{BCA} (mg/mL)	a _{esp} -UDP-Gal (U/mg _{prot tot})	U _{extracte}	U _{extracte} relatives
1	5.3	0.16	1.25	54
2	9.3	0.17	2.33	100
3	8.0	0.13	1.55	67
4	8.3	0.13	1.64	70
5	7.2	0.13	1.45	62
6	7.5	0.11	1.22	52
7	6.8	0.22	2.30	99
8	6.6	0.15	1.51	65
9	4.8	0.08	0.55	23
10	6.7	0.11	1.08	46

Volum cultiu: 20 mL; volum extracte: 1.5 mL; condicions assaig d'activitat: 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG, 12.5 mM DOPG, 1 mM UDP-¹⁴C-Gal, 3 µg proteïna total i T_{reacció} = 35 °C.



L'avaluació del paper de cadascun dels components dels tampons per separat proporciona aquestes conclusions:

- Si la concentració de NaCl és elevada, el CHAPS és més efectiu en concentracions baixes. Per contra, quan la concentració de NaCl és menor, cal augmentar la concentració de CHAPS per tenir una bona extracció de GT-MG517.
- La presència de glicerol és clau, ja que un tampó que només conté CHAPS com a agent solubilitzador és el que proporciona uns resultats més pobres. En els casos en què la concentració de NaCl és elevada, els millors resultats s'obtenen amb concentracions altes de glicerol, mentre que quan la concentració de NaCl és baixa, la concentració de glicerol no és determinant.

- La presència de NaCl també és requerida, ja que el tampó que no en conté és el segon pitjor de tots els provats.

Globalment existeixen dos tampons que destaquen per sobre la resta. Són el T2 (20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 20 mM CHAPS i 10 % glicerol) i el T7 (20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol). D'aquests es decideix escollir T7 per a la purificació de GT-MG517 a escala d'un litre de cultiu perquè és aquell que discrimina millor la glicosiltransferasa davant la resta de proteïnes d'*E.coli* en el moment de la solubilització, ja que si bé proporciona un extracte amb una concentració de proteïna total inferior que T2, l'activitat específica de l'esmentat extracte és quelcom més gran que la de T2.

4.5.2 Purificació de GT-MG517 solubilitzada amb CHAPS mitjançant cromatografia d'afinitat

La purificació de GT-MG517 es realitza a partir d'un litre de cultiu de cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 cotransformades amb els plasmidis pET517HisC i pGro7 seguint el protocol 9.1.3 descrit en la *Part Experimental*. El tampó d'extracció que s'utilitza és aquell seleccionat com a millor en l'apartat anterior: 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol.

4.5.2.1 Cromatografia d'afinitat en presència de CHAPS

Inicialment és aquest extracte el que es carrega a la columna d'afinitat de Ni²⁺ (HisTrap™ HP – GE), la qual posteriorment s'elueix mitjançant un gradient de 0 a 500 mM d'imidazole amb el tampó d'elució 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol i 500 mM imidazole (Protocol 9.2 de la *Part Experimental*).

En aquest cas es decideix realitzar l'elució directament a partir d'un gradient d'imidazole, ja que teòricament així se separen millor les impureses que puguin trobar-se també immobilitzades a la columna, a part de la proteïna d'interès GT-MG517. S'espera que el nombre d'aquestes sigui important ja que el tampó de solubilització, que és també el tampó de càrrega de la columna, no conté imidazole ja que deriva de l'optimització de tampons explicada en el punt anterior.

En la Figura 4.18 es presenten els resultats obtinguts. S'observa com la resolució entre el pic d'impureses (fracció A3 en el gel de SDS-PAGE) i el pic corresponent a la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* (fraccions A7 – B8 en els gels de SDS-PAGE) no és prou bona. Aquest fet causa la presència de múltiples proteïnes no desitjades en la mostra final, la qual resulta de la combinació de les diverses fraccions que contenen GT-MG517 i la seva diàlisi contra un tampó de composició 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol, és a dir T7.

Cal dir que per a les esmentades fraccions de GT-MG517 es realitza una extracció amb cloroform/MeOH per a l'anàlisi dels possibles lípids que puguin acompanyar la proteïna. El resultat és la inexistència de lípids en aquestes fraccions, fet que confirma el detergent CHAPS com a agent capaç d'intercanviar-se pels lípids de membrana associats a la proteïna, igual com passava amb el Triton x-100.

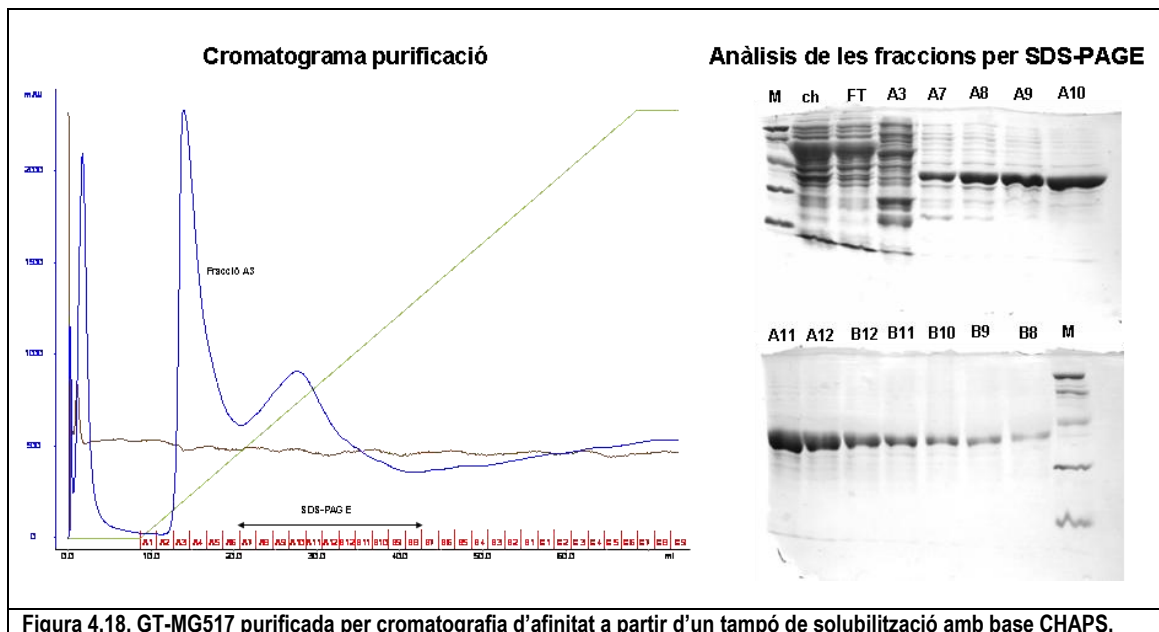


Figura 4.18. GT-MG517 purificada per cromatografia d'afinitat a partir d'un tampó de solubilització amb base CHAPS.

La mostra final de proteïna es quantifica a partir del mètode de BCA (Protocol 9.6.2 de la *Part Experimental*), el qual proporciona una concentració de GT-MG517 de 1.33 mg/mL, molt semblant a l'obtinguda en el procés de purificació de la glicosiltransferasa solubilitzada amb Triton x-100. El rendiment del cultiu en aquest cas és quelcom inferior, al voltant de 30 mg de proteïna per litre de cultiu.

Amb l'objectiu de millorar la resolució entre el pic d'impureses i el de GT-MG517 s'inclou un canvi en el gradient realitzat amb el tampó d'elució. Aquest consisteix en l'aplicació del mateix gradient anterior fins al moment en el qual apareix la màxima intensitat del pic d'impureses, en el qual la concentració d'imidazole es manté constant fins que es recupera la línia de base anterior a la sortida del pic. S'espera que aquest procediment elimini gran part de les proteïnes unides inespecíficament a la columna, abans que tingui lloc l'elució de GT-MG517. Aquesta, per la seva banda, es realitza mitjançant dos procediments diferents: a partir del mateix gradient realitzat anteriorment i a partir d'un graó d'imidazole. L'objectiu de l'esmentat graó és augmentar la concentració de la proteïna que es recupera. Cal recordar que la realització d'un gradient millora la separació entre proteïnes, però també dilueix les mostres. Si el gradient inicial aconsegueix eluir la major part de les impureses, un graó d'imidazole no ha de suposar un increment d'aquestes en la mostra.

A la Figura 4.19a es presenta el resultat de la cromatografia d'afinitat en la qual s'han combinat dos gradients d'imidazole, el primer per eliminar les impureses immobilitzades inespecíficament i el segon per eluir GT-MG517. En els gels de SDS-PAGE es pot apreciar que la proteïna que es recupera es troba més neta que la dels gels de la Figura 4.18. No obstant, la concentració de proteïna final, que és de 0.31 mg/mL, és inferior. Aquest valor és el que proporciona el mètode de BCA realitzat sobre la mostra de proteïna obtinguda en unir totes les fraccions (C10 – D6) i dialitzar-les contra el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol. La menor concentració de glicosiltransferasa pot explicar-se per l'absència de totes les impureses que el gradient inicial elimina, ja que aquestes també compten en l'assaig per a la quantificació de proteïna.

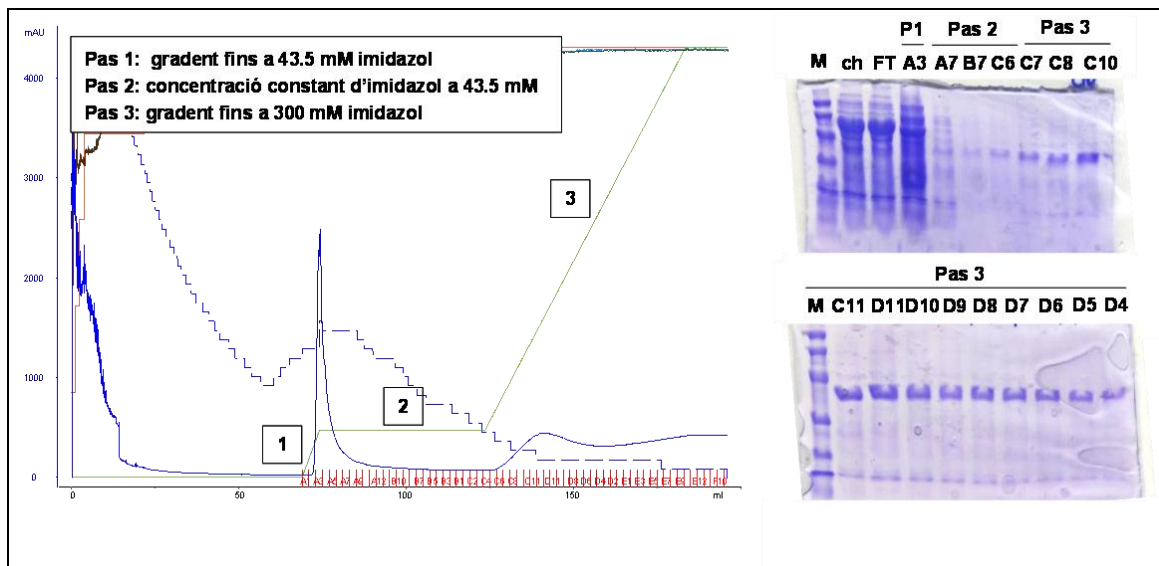


Figura 4.19a. GT-MG517 purificada per cromatografia d'afinitat mitjançant la combinació de dos gradients d'imidazole.

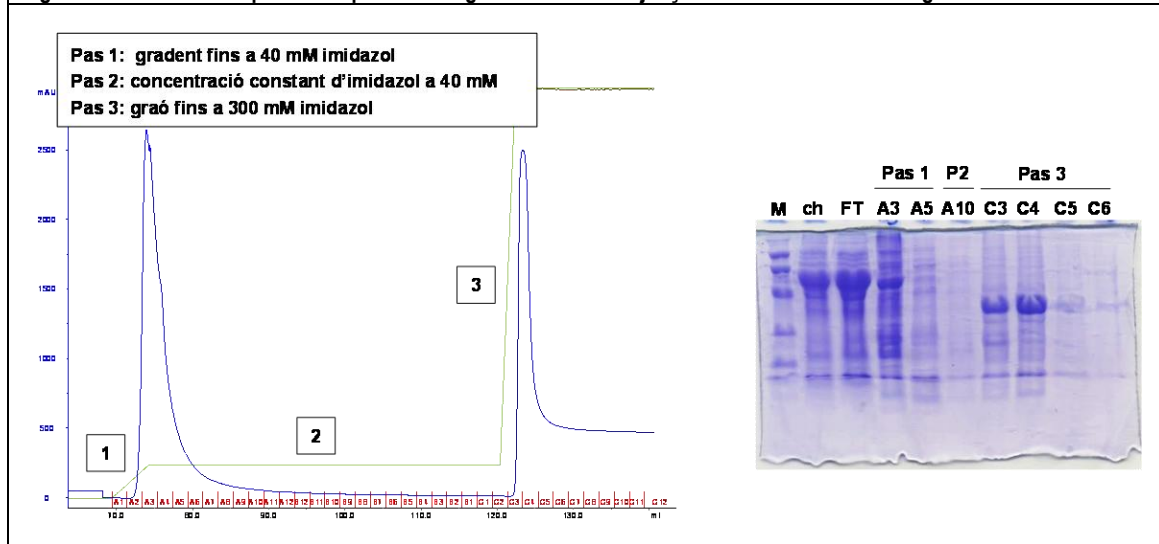


Figura 4.19b. GT-MG517 purificada per cromatografia d'afinitat mitjançant la combinació d'un gradient i un gràó d'imidazole.

A la Figura 4.19b es recullen els resultats per a la cromatografia d'afinitat realitzada a partir de la combinació d'un gradient inicial per eliminar impureses i un gràó posterior per eluir GT-MG517. La proteïna que es recupera mitjançant aquest procediment es troba molt concentrada (5.1 mg/mL per BCA), però si s'analitza el nivell d'impureses que l'acompanya, és superior al de les purificacions anteriors. Caldria doncs analitzar si la major concentració compensa el major nombre d'impureses, sobretot tenint en compte que permetria acoblar un segon pas de purificació com ara una columna de gel-filtració.

4.5.2.2 Cromatografia d'afinitat en absència de CHAPS

En aquest punt es descriu la purificació de GT-MG517 a partir d'un tampó de solubilització amb base CHAPS, però amb l'eliminació del detergent quan la proteïna es troba immobilitzada a la columna d'afinitat, igual com s'ha descrit per al Triton x-100 en el punt 4.4.3.3 del present capítol.

Així doncs, GT-MG517 provinent d'un litre de cultiu i solubilitzada amb el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol es carrega a la columna de Ni^{2+} . A continuació el detergent s'elimina mitjançant el pas per l'esmentada columna d'un tampó de rentat de composició 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20 % glicerol. Un cop eliminat el detergent es realitzen dos protocols diferents per comparar la qualitat de la proteïna que cadascun d'ells proporciona. El primer protocol consisteix en l'elució de GT-MG517 a partir d'un gradient de 0 a 500 mM d'imidazole, igual com s'ha dut a terme anteriorment quan el tampó d'elució contenia CHAPS, mentre que el segon combina un gradient per eliminar impureses i un graó per obtenir GT-MG517, procediment també provat amb el tampó amb CHAPS i que ha proporcionat una proteïna amb una concentració molt alta (veure Protocol 9.2 de la *Part Experimental*).

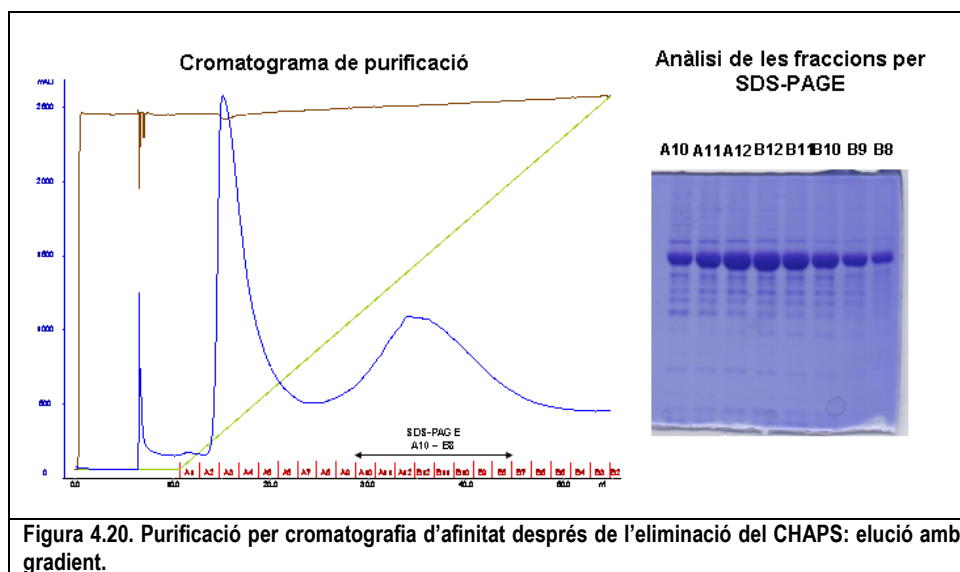


Figura 4.20. Purificació per cromatografia d'afinitat després de l'eliminació del CHAPS: elució amb gradient.

A la Figura 4.20 es presenten el cromatograma i l'anàlisi per SDS-PAGE de la proteïna purificada segons el primer dels protocols descrit en el paràgraf anterior. Si es compara el perfil d'elució amb l'obtingut amb el tampó amb CHAPS (Figura 4.18), s'observa com la resolució entre el pic d'impureses i el pic de GT-MG517 és molt millor, segurament degut a l'eliminació prèvia per part del tampó de rentat d'algunes d'aquestes impureses. No obstant, la quantitat de proteïnes que coelueixen amb la glicosiltransferasa és força important. La unió de les fraccions A10 – B8 i la seva diàlisi contra un tampó de composició 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20 % glicerol proporciona una proteïna de concentració 0.8 mg/mL pel mètode de BCA.

Els resultats del segon dels protocols provats es recullen a la Figura 4.21. La proteïna així obtinguda presenta una concentració per BCA de 2.45 mg/mL, analitzada després de la diàlisi de la fracció B11 del gel de SDS-PAGE contra un tampó de composició 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20 % glicerol.

Evidentment el procediment en el qual GT-MG517 s'elueix amb un graó proporciona una concentració més elevada que aquell en el qual s'elueix amb un gradient, però el perfil d'impureses és força equivalent. Per tant, donat que un dels objectius d'un protocol de purificació és l'obtenció d'una proteïna el màxim de concentrada possible, es considera que aquest és millor que el que elueix GT-MG517 amb un gradient.

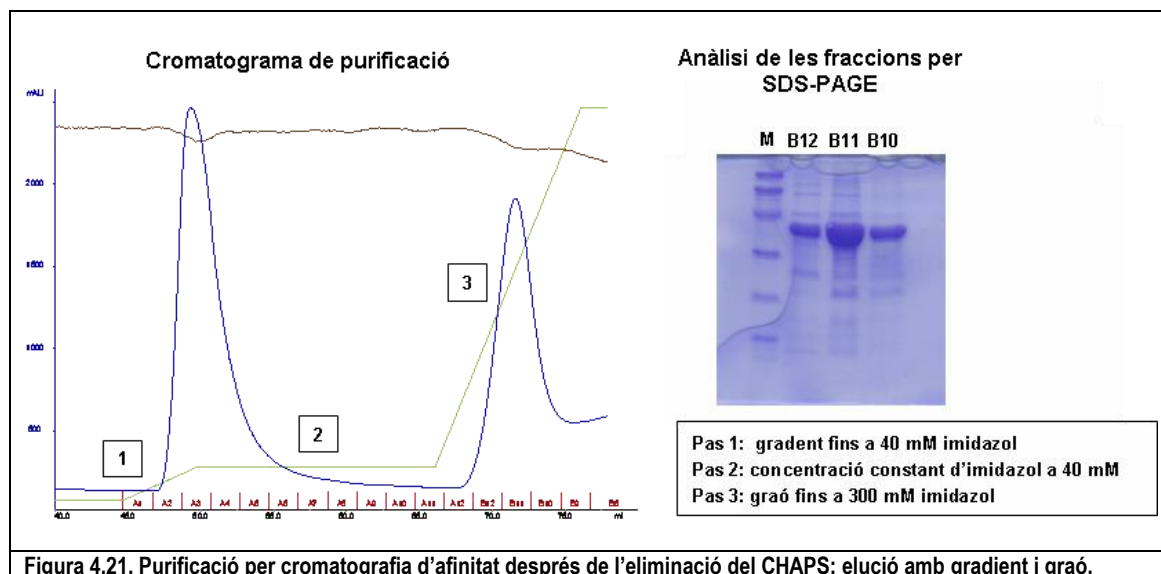


Figura 4.21. Purificació per cromatografia d'afinitat després de l'eliminació del CHAPS: elució amb gradient i graó.

4.5.2.3 Selecció del millor protocol de purificació de GT-MG517 per cromatografia d'afinitat

Per tal d'escollir quin dels procediments de purificació de GT-MG517 realitzats a partir de la seva solubilització amb el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol és el més adequat, es presenta a la Taula 4.14 un resum de tots ells, considerant la concentració i la puresa de la proteïna que proporcionen.

En tots els casos, l'eliminació del detergent implica la disminució de la concentració de proteïna, si bé en millora la puresa, ja que el procés de rentat amb el tampó sense detergent arrossega algunes de les impureses que s'han immobilitzat a la columna junt amb GT-MG517. Si es comparen l'elució amb gradient i l'elució amb graó, és evident que amb aquest últim s'obté una concentració major de proteïna, en detriment de la puresa de la mostra, la qual es ressent de la manca del procés de gradient en el qual la concentració d'imidazole s'incrementa de forma gradual i, d'aquesta manera, propicia una elució també gradual de les impureses immobilitzades conjuntament amb GT-MG517.

Taula 4.14. Resum dels processos de purificació realitzats a partir de l'extracte amb CHAPS.

Tampó solubilització / tampó càrrega	Tampó rentat	Tampó elució	Mode elució (valors en mM imidazole)	Resultat	
				[prot] _{BCA}	puresa
20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol	-	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 - 500	1.33 mg/mL	++
			Gradient 0 - 40 Constant a 40	0.31 mg/mL	+++
			Gradient 40 - 500	5.1 mg/mL	+
	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 - 40 Constant a 40 Graó 500	0.8 mg/mL	++
			Gradient 0 - 500	2.45 mg/mL	++
			Gradient 0 - 40 Constant a 40 Graó 500		

A partir dels valors de concentració de proteïna, es podria pensar en l'aplicació d'un procés de concentració amb un dispositiu del tipus centricon. Sempre que s'ha intentat, el resultat ha estat la precipitació de la proteïna, la qual

sembla que no suporta bé l'esmentat procés. Per tant, és preferible l'obtenció directa d'una proteïna més concentrada, encara que la mostra sigui més rica en impureses.

En conclusió, es decideix que el millor dels protocols provats és aquell que inclou un pas de rentat previ per eliminar el CHAPS i a continuació, un primer gradient d'eliminació d'impureses i finalment, un graó per acabar eluint GT-MG517 amb una concentració moderada però suficient que permeti realitzar un altre mètode de purificació per incrementar la puresa de la glicosiltransferasa.

4.5.3 Aplicació de la cromatografia d'hidroxiapatita a la purificació de GT-MG517

La cromatografia d'hidroxiapatita basa la separació de biomolècules en efectes electrostàtics que esdevenen entre ions del material ceràmic i les càrregues de les proteïnes. Però aquest no és l'únic patró de separació que ofereix l'hidroxiapatita, ja que en tractar-se d'un material que pot aglomerar-se i formar partícules, permet també establir camins preferencials en funció de la mida de les proteïnes. Tanmateix, el comportament d'una proteïna dins d'una matriu d'hidroxiapatita és imprevisible i cal provar-se experimentalment.

Aquesta cromatografia no és tan utilitzada com altres cromatografies emprades en la present tesi, com la d'afinitat o la de gel-filtració, però en bibliografia es troben molts exemples en els quals s'ha emprat com a mètode de purificació, alguns dels quals es recullen en la Taula 4.15.

Taula 4.15. Cromatografia d'hidroxiapatita aplicada a la purificació de proteïnes.

Proteïna	Procés de purificació	Ref. bibliogràfica
MGlcDG sintasa <i>Acholeplasma laidlawii</i>	1 – Intercanvi iònic 2 – Gel-filtració 3 – Hidroxiapatita	Karlsson, O., <i>et al</i> , 1997
DGlcDG sintasa <i>Acholeplasma laidlawii</i>	1 – Intercanvi iònic 2 – Hidroxiapatita 3 – Afinitat per lligand	Vikström, S., <i>et al</i> , 1999
MGDG sintasa d'espinaç	Hidroxiapatita	Covés, J., <i>et al</i> , 1988 Botté, C., <i>et al</i> , 2005
β -manosidasa <i>Pyrococcus furiosus</i>	1 – Intercanvi iònic 2 – Interacció hidrofòbica 3 – Hidroxiapatita 4 – Gel-filtració	Bauer, M., <i>et al</i> , 1996
Cel·lobiosa fosforilasa <i>Cellulomonas uda</i>	1 – Intercanvi iònic 2 – Hidroxiapatita 3 – Interacció hidrofòbica 4 – Gel-filtració	Nidetzky, B., <i>et al</i> , 2000
Gal-3-O-sulfotransferasa porcina	1 – Hidroxiapatita 2 – Afinitat per ConA 3 – Afinitat per Cu 4 – Afinitat per AMP	Seko, A., <i>et al</i> , 2005
α -2,6-sialiltransferasa <i>Photobacterium damsela</i>	1 – Intercanvi iònic 2 – Hidroxiapatita	Teo, C., <i>et al</i> , 2005
Complex proteic localitzat a l'aparell de Golgi (COG)	1 – Intercanvi iònic 2 – Hidroxiapatita	Ungar, D., <i>et al</i> , 2002
Trealosa fosforilasa <i>Schizophyllum comune</i>	1 – Intercanvi iònic 2 – Hidroxiapatita 3 – Gel-filtració	Goedl, C., <i>et al</i> , 2006

S'observa com en únic cas la cromatografia d'hidroxiapatita és l'únic procés de purificació que es realitza sobre una proteïna. En tots els altres exemples, cal acoblar-la a altres mètodes per aconseguir el grau de puresa desitjat. També pot apreciar-se que, excepte en el cas de la sulfotransferasa, la cromatografia d'hidroxiapatita no és el primer mètode de purificació que s'aplica sobre la mostra.

La cromatografia d'hidroxiapatita és compatible amb concentracions elevades de glicerol (10 % [Seko, A., *et al*, 2005; Ungar, D., *et al*, 2002] i 20 % [Karlsson, O., *et al*, 1997; Vikström, S., *et al*, 1999]) i amb detergents com CHAPS [Karlsson, O., *et al*, 1997; Vikström, S., *et al*, 1999; Covés, J., *et al*, 1988] o Triton x-100 [Seko, A., *et al*, 2005; Teo, C., *et al*, 2005]. Ja que entre els exemples inclosos en la Taula 4.15 es troben algunes glicosiltransferases productores de glicolípid, es decideix intentar l'aplicació de la cromatografia d'hidroxiapatita a les mostres de GT-MG517 purificades primer per cromatografia d'afinitat.

La cromatografia d'hidroxiapatita s'aplica sobre una mostra de GT-MG517 purificada de la següent manera: solubilització amb el tampó 7 de la Taula 4.12, immobilització en una columna d'afinitat amb Ni^{2+} i elució de la proteïna en dues fases: gradient fins a 40 mM d'imidazole per eliminar impureses immobilitzades inespecíficament i graó fins a 500 mM d'imidazole per eluir GT-MG517. La proteïna recuperada es dialitza contra el tampó 7 inicial de composició 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol. La concentració de la glicosiltransferasa així obtinguda és de 2.9 mg/mL calculada amb el mètode de BCA.

L'esmentada mostra es carrega en una columna d'hidroxiapatita Bio-Gel® HT de Bio-Rad. La cromatografia té lloc segons es descriu en el Protocol 9.4 de la *Part Experimental*. A la Figura 4.22 es presenta el perfil cromatogràfic de la columna d'hidroxiapatita i l'anàlisi de les fraccions recollides per SDS-PAGE.

La major part de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* no s'adsorbeix a la columna d'hidroxiapatita, com es demostra en les fraccions B11 – B2 del gel de SDS-PAGE corresponent al primer pic de la cromatografia. Per tant, no es troba sotmesa a l'acció cromatogràfica pretesa amb la columna. En el segon pic s'observa senyal de GT-MG517, tot i que és residual si es compara amb la del primer pic on es queda la major part de la proteïna.

El motiu per aquest comportament de GT-MG517 es desconeix. Tot i que no s'ha determinat el punt isoelectríic real de la proteïna, el valor teòric calculat és de 9.22. Si el pH del tampó d'elució de la columna és de 8, s'espera que la proteïna presenti una càrrega neta positiva i els seus grups amino interaccionin amb els fosfats de la resina, cosa que es demostra no ocorre.

La unió de les fraccions B6 – B3 proporciona una concentració de GT-MG517 de 0.3 mg/mL amb un volum total de 8 mL de mostra. Inicialment es partia de 4 mL d'una proteïna concentrada (2.9 mg/mL). Per tant, dels gairebé 12 mg de proteïna carregats a la columna d'hidroxiapatita, només se'n recuperen 2.5. Evidentment, una part de la pèrdua és en forma d'impureses, però únicament aquestes no poden explicar la poca quantitat de proteïna que es recupera. Per observar la puresa de GT-MG517 un cop eluïda de la columna d'hidroxiapatita, la glicosiltransferasa es concentra mitjançant una nova immobilització en una columna d'afinitat i una elució a partir d'un graó d'imidazole. S'aprecia com, si bé s'han eliminat moltes impureses, aquelles més intenses en el gel de SDS-PAGE corresponent a la mostra carregada, continuen en la mostra final (gels de SDS-PAGE de la Figura 4.22).

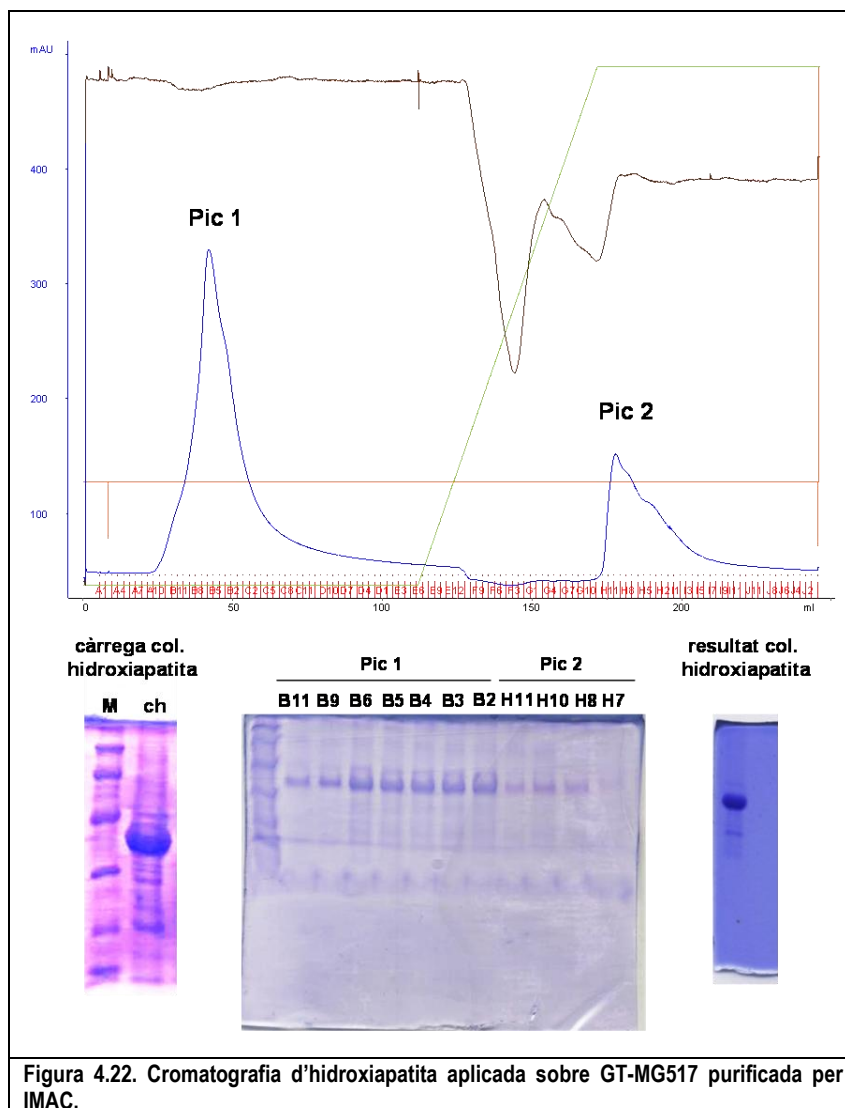


Figura 4.22. Cromatografia d'hidroxiapatita aplicada sobre GT-MG517 purificada per IMAC.

En conclusió, es considera que, ja que GT-MG517 no s'adsorbeix a la resina d'hidroxiapatita, no es troba sotmesa a un procés cromatogràfic. Així, la funció de la columna és la de retenir algunes impureses, però no la de proporcionar una separació cromatogràfica dels diferents components de la mostra, la qual, per contra, es dilueix àmpliament. Per tant, es decideix que la cromatografia d'hidroxiapatita no és adequada per a la purificació de GT-MG517, com a mínim en les condicions explicades en aquest punt, i s'opta per una tècnica cromatogràfica diferent per aconseguir aïllar la glicosiltransferasa amb un grau de puresa superior.

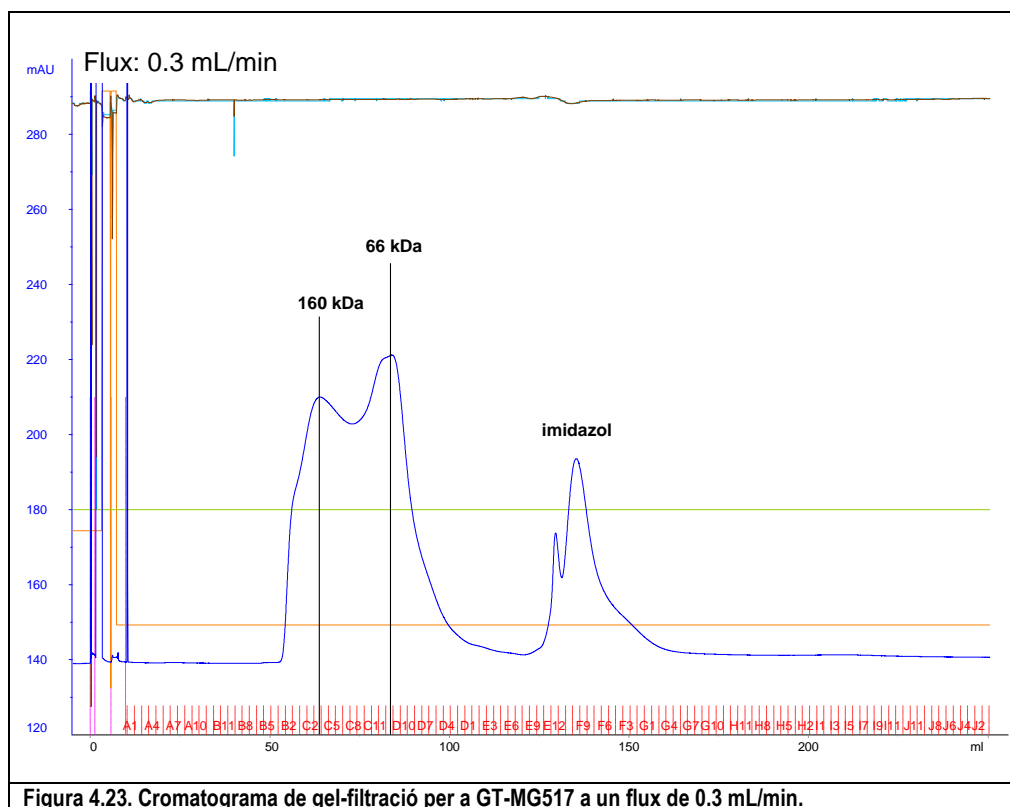
4.5.4 Aplicació de la cromatografia de gel-filtració a la purificació de GT-MG517

L'aïllament de GT-MG517 per cromatografia d'afinitat a partir d'un extracte proteic solubilitzat amb CHAPS genera una proteïna acompanyada d'impureses (veure Figura 4.21). És, doncs, necessari l'acoblament d'un altre pas de purificació posterior a la cromatografia d'afinitat i es decideix aplicar la cromatografia de gel-filtració, amb l'esperança d'una millor resolució que l'observada en les mostres provinents d'extractes de Triton x-100. Cal recordar que en aquests, la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* es troba formant agregats solubles, els quals inclouen oligòmers de GT-MG517 i també agregats amb dues impureses que l'acompanyen després de la purificació per

cromatografia d'afinitat i que no és possible la seva separació per gel-filtració, tant si el tampó d'aquesta cromatografia conté detergent, com si s'elimina prèviament i se substitueix per glicerol.

Per estudiar què ocorre amb GT-MG517 purificada des de l'extracte de CHAPS, es treballa amb mostres de proteïna que es troben en el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20 % glicerol, però que no s'han sotmès a diàlisi i, per tant, contenen imidazole. Ja que s'elueixen de la columna d'afinitat mitjançant un graó, la seva concentració és elevada, però la presència de l'imidazole impedeix quantificar-la degut a la seva incompatibilitat amb l'assaig de BCA emprat habitualment. La columna de gel-filtració que s'empra és una XK 16 Superdex™ 200 de GE Healthcare empaquetada en el laboratori, ja descrita en el punt 4.4.3.3, la qual s'elueix amb un tampó de composició 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20 % glicerol. Cal observar que com que el tampó d'elució no conté imidazole, la columna de gel-filtració servirà també per eliminar aquest compost de les mostres de proteïna.

En la Figura 4.23 es presenta el cromatograma obtingut per una mostra de GT-MG517 eluïda amb un flux de 0.3 mL/min. Mitjançant la calibració de la columna amb proteïnes de pes molecular conegut, és possible establir els pesos corresponents a cadascun dels pics que s'observen, dels quals cap correspon al monòmer de la glicosiltransferasa (42 kDa).



L'anàlisi del contingut de cadascuna de les fraccions per SDS-PAGE és difícil, degut a les baixes concentracions de proteïna presents en aquestes. Ara bé, amb l'objectiu de millorar la resolució entre els pics de 160 i 66 kDa, es repeteix la cromatografia, tot disminuint el flux de l'elució a 0.2 mL/min. A la Figura 4.24 es presenta el nou cromatograma. Cal dir que en aquest cas la mostra de glicosiltransferasa carregada a la columna de gel-filtració té una concentració superior, fet que en facilita la posterior visualització de les fraccions per SDS-PAGE.

L'efecte de la disminució del flux genera l'aparició d'un nou pic de pes molecular superior al de 160 kDa, que ja s'intueix en el cromatograma de la Figura 4.23 i el qual té un pes molecular de 198 kDa. Ara bé, l'esperada millora en la resolució dels pics de l'anterior cromatografia no s'observa. Al contrari, en la nova mostra aquests es perden. Una hipòtesi que explicaria aquest comportament és que, ja que la mostra té una concentració superior que l'anterior, es formen agregats de major pes molecular, que es reflecteixen en l'esmentat nou pic. En canvi, aquells de menor pes molecular disminueixen en intensitat, tal com ocorre amb el pic de 66 kDa, el qual en proporció respecte els altres, perd importància en el cromatograma de la Figura 4.24.

En la gel-filtració de 0.2 mL/min tampoc és possible distingir el monòmer de GT-MG517. No obstant, els gels de SDS-PAGE posen de manifest la seva presència en les mostres, com a mínim quan aquestes es desnaturalitzen. Sembla doncs que la hipòtesi dels agregats solubles, ja comentada en les cromatografies de gel-filtració realitzades amb mostres de proteïna solubilitzada amb Triton x-100, es reforça. Cal recordar que els esmentats agregats inclouen, a més de GT-MG517, les impureses que l'acompanyaven. En aquest cas ocorre el mateix, ja que les diferents fraccions resultants de la cromatografia contenen les mateixes impureses que la mostra carregada a la columna, però més diluïdes degut a l'efecte d'aquesta (veure gels de la Figura 4.24). Ara bé, si es considera que la proporció d'impureses respecte la proteïna d'interès és petita, els agregats més probables són oligòmers de GT-MG517 constituïts per diverses unitats de glicosiltransferasa.

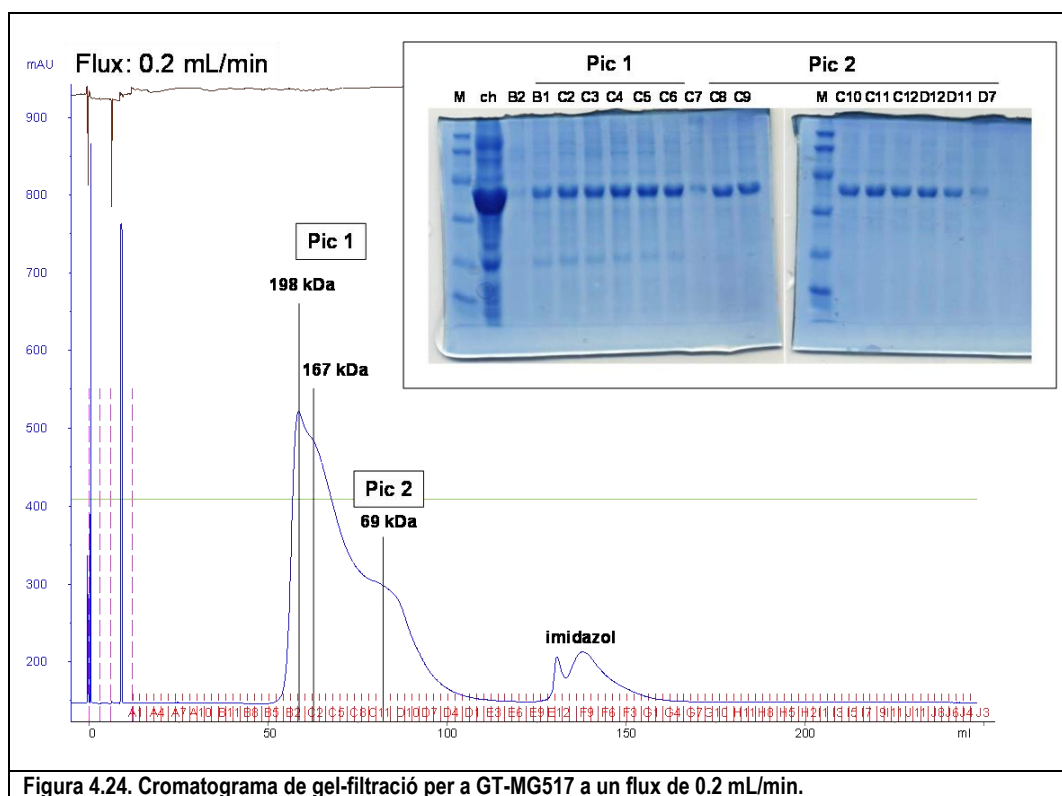


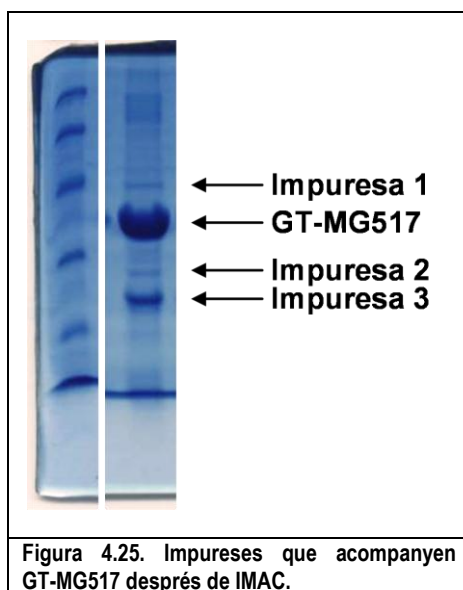
Figura 4.24. Cromatograma de gel-filtració per a GT-MG517 a un flux de 0.2 mL/min.

Així doncs, sembla que GT-MG517 solubilitzada amb un tampó amb base CHAPS també forma agregats solubles, ja sigui a partir de diversos monòmers de la pròpia glicosiltransferasa o mesclés d'aquests amb les proteïnes que en constitueixen les impureses.

4.5.4.1 Identificació per MALDI de les impureses que coelueixen amb GT-MG517

Tal com s'ha realitzat amb les impureses que acompanyen GT-MG517 en les mostres que provenen de la proteïna solubilitzada amb Triton x-100, es decideix sotmetre aquelles impureses majoritàries de les mostres solubilitzades amb CHAPS a una digestió triptica a partir de la seva extracció d'un gel de SDS-PAGE i analitzar la seva identitat per MALDI-TOF.

A la Figura 4.25 es presenta el gel que s'ha utilitzat i aquelles bandes que s'han analitzat. Cal dir, però, que degut a la poca claredat dels resultats que proporcionava la tècnica de MALDI, ha estat necessària l'aplicació d'un mètode de LC-ESI-MSMS per avaluar els fragments generats per la digestió triptica de les bandes.

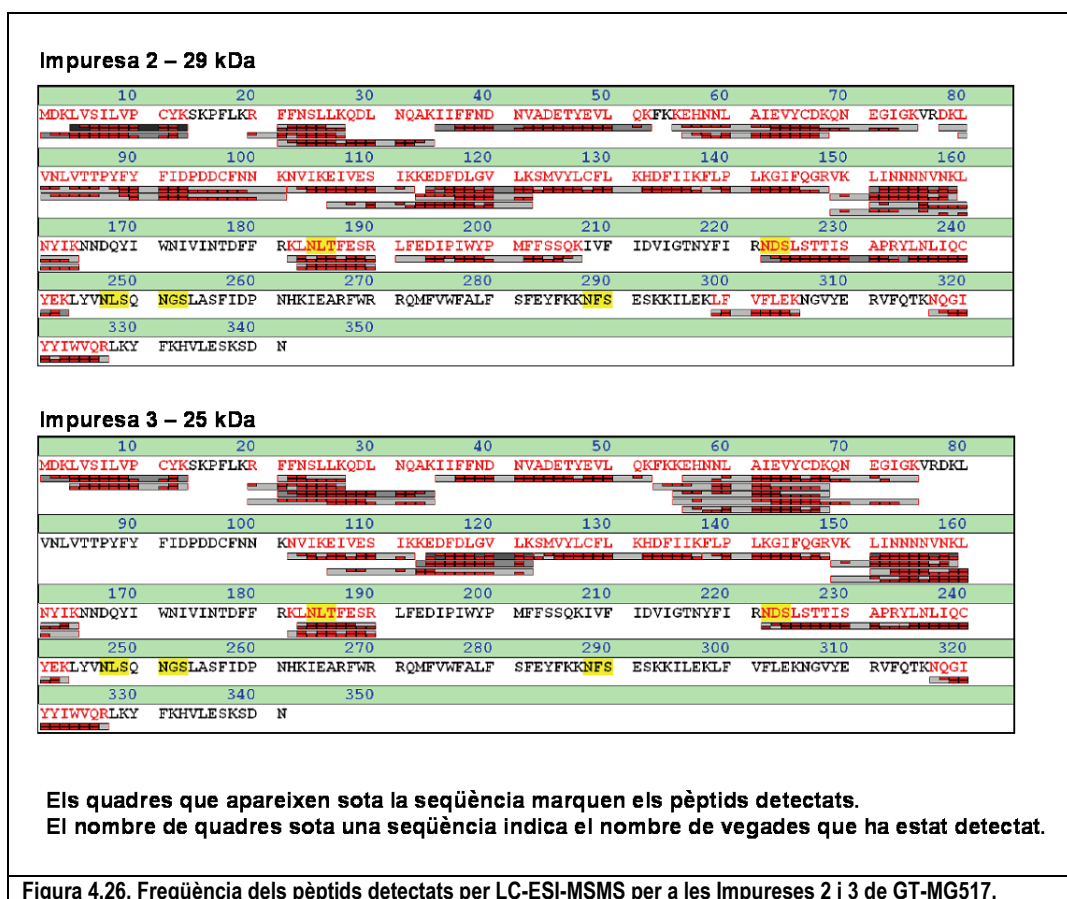


Amb aquest s'ha establert que la banda adjudicada per pes molecular a GT-MG517 correspon efectivament a la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* i que, a més, presenta com a impuresa una D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa d'*E.coli*, la qual constitueix el 15 % de la proteïna total. Pel que fa a les bandes anomenades Impuresa 2 i Impuresa 3, ambdues corresponen principalment a GT-MG517, la qual cosa significa que són productes de degradació de la glicosiltransferasa. Ara bé, cal dir que en tots dos casos també es troben impurificades amb altres proteïnes d'*E.coli*. Per a la Impuresa 2 la més destacada d'aquestes proteïnes d'*E.coli* és una cloramfenicol acetiltransferasa, la qual representa un 9 % de la proteïna total de la banda, mentre que per a la Impuresa 3 és una proteïna anomenada "UPF0227 protein ycfP" i que significa un 7 % de la proteïna total.

Pel que fa a la banda etiquetada com a Impuresa 1, es determina que es troba constituïda per una mescla de proteïnes d'*E.coli*, entre les quals destaquen el factor d'elongació Tu 1 (23 %), una cisteïna desulfurasa (13 %) i una citrat sintasa (10 %). No obstant, els resultats mostren que GT-MG517 també forma part de la mescla (18 %). Podria ser, doncs, que es tractés d'un agregat de la proteïna o, més probable, d'un efecte de "rastre" deixat en el gel motivat per la gran quantitat de proteïna present en la banda etiquetada com a GT-MG517 en la Figura 4.25.

El pes molecular de la Impureza 2 és de 29 kDa, mentre que el de la Impureza 3 és de 25 kDa (valors predits segons el desplaçament de les bandes en el gel de SDS-PAGE de la Figura 4.25 amb referència a les bandes del marcador). L'avaluació dels pèptids que s'identifiquen amb l'espectròmetre de masses pot donar informació sobre el punt en el qual ha tingut lloc la degradació de GT-MG517.

Amb aquesta finalitat, els esmentats pèptids es presenten a la Figura 4.26. S'observa com els pèptids que s'identifiquen amb més freqüència formen part de l'extrem N-terminal de la proteïna, aquell que conté el domini d'unió del substrat donador i que es considera el domini catalític de l'enzim. En canvi, pèptids de l'extrem C-terminal presenten una freqüència molt més baixa d'identificació. Això podria indicar que és aquesta part de la proteïna la que es perd en el procés de degradació. Ara bé, cal dir que la cua d'His que facilita la purificació de GT-MG517 es troba justament a l'extrem C-terminal. Si aquesta es degrada i desapareix, no existeix justificació per a la presència en les mostres purificades per cromatografia d'afinitat dels fragments de la glicosiltransferasa que han perdut la cua, amb l'excepció que aquests estiguessin formant algun altre tipus d'unió amb la proteïna completa i co-eluïssin amb ella, tot i l'absència de les His finals.



La hipòtesi de la formació d'agregats solubles entre GT-MG517 i els seus productes de degradació, els quals en un gel de SDS-PAGE apareixerien separats degut a la desnaturalització del complex, podria explicar el pic de pes molecular 66 kD que apareix en la cromatografia de gel-filtració (Figura 4.23 o 69 kD en la Figura 4.24), el qual correspon a la suma del pes molecular de la glicosiltransferasa (42 kDa) i el de la Impureza 3 (25 kDa), que és el producte de degradació majoritari segons la intensitat de la banda del gel de la Figura 4.25.

La identificació de les impureses majoritàries que acompanyen GT-MG517 després de la seva purificació per cromatografia d'afinitat revela que realment no són altres proteïnes d'*E.coli*, sinó que són productes de degradació de la mateixa glicosiltransferasa. Això significa que el procés de solubilització de GT-MG517 amb CHAPS permet obtenir una proteïna, si bé no lliure completament d'impureses, com ho demostren les bandes que apareixen en els gels de SDS-PAGE, sí sense altres proteïnes presents en concentracions equivalents a la de la glicosiltransferasa, com passa quan aquesta es solubilitza amb Triton x-100. La incorporació d'inhibidors de proteases als tampons pot solucionar la degradació que té lloc i permetre l'observació de la mostra real que es recupera després de la cromatografia d'afinitat.

4.6 Selecció del procediment més adequat de purificació de GT-MG517

Tot el treball descrit en el present capítol té un doble objectiu. Per una banda, la purificació de GT-MG517 amb la finalitat d'obtenir cristalls i determinar l'estructura tridimensional de la proteïna. Per l'altra, la seva purificació per a sotmetre l'enzim a un estudi cinètic que aportí informació sobre la seva activitat. Per al primer dels objectius és necessària una concentració de proteïna molt elevada, al voltant de 10 mg/mL, i d'una puresa excepcional. En canvi, per al segon objectiu els requeriments no són tan estrictes, ja que és possible realitzar assajos cinètics amb una mostra de proteïna d'una puresa situada al voltant del 90 % i una concentració molt inferior a l'esmentada per al procés de cristal·lització.

És clar que cap dels protocols anteriors és capaç de produir una proteïna apta per a cristal·lització. Per això, serà necessari continuar el treball experimental i introduir noves formes de purificació de GT-MG517, les quals afavoreixin la separació de l'enzim i les impureses que l'acompanyen i, a la vegada, generin mostres on aquest no formi agregats solubles d'elevat pes molecular. Un bon punt d'inici seria la determinació del punt isoelèctric real de GT-MG517 i, a partir d'aquí, introduir la tècnica de la cromatografia de bescanvi iònic, la qual, si bé ha estat utilitzada sense èxit en alguna prova de purificació de la present tesi, presenta possibilitats. Cal tenir present que la majoria de processos de purificació requereixen diverses tècniques cromatogràfiques, tal com es reflecteix en les dades de la Taula 4.15. Una altra possibilitat seria la recuperació dels detergents de tipus alquil glucòsid, els quals han donat resultats esperançadors pel que fa a la disminució dels agregats solubles en les mostres extretes amb tampons de Triton x-100.

L'obtenció d'una proteïna apte per a estudis cinètics sí que és factible a partir dels procediments explicats en els punts anteriors del present capítol. Cal, però, establir quin d'ells és el més adequat. Al llarg del capítol s'han desenvolupat les diferents experiències realitzades amb extractes proteics que contenen GT-MG517, en un cas solubilitzada per un tampó amb base al detergent Triton x-100 i en l'altre, per un tampó amb base al detergent CHAPS. En cada cas s'ha determinat un protocol considerat el millor. En la Figura 4.27 es resumeixen ambdós procediments, ja que això en facilitarà la comparació.

Extracció amb Triton x-100	Extracció amb CHAPS
<ol style="list-style-type: none"> 1. Solubilització de GT-MG517 amb el tampó 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100, 5 % glicerol i 20 mM imidazol 2. Immobilització en una columna d'afinitat 3. Eliminació del detergent mitjançant el rentat amb el tampó 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl i 20 % glicerol 4. Elució de la columna a partir d'un gradient d'imidazol de 60 min amb el tampó 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 20 % glicerol i 500 mM imidazol 5. Diàlisi contra el tampó 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl i 20 % glicerol 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Solubilització de GT-MG517 amb el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol 2. Immobilització en una columna d'afinitat 3. Eliminació del detergent mitjançant el rentat amb el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20 % glicerol 4. Elució de la columna en tres passos amb el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol i 500 mM imidazol: <ul style="list-style-type: none"> • gradient d'imidazol fins a 40 mM per eliminar impureses • 40 mM constant fins a recuperació de línia de base • Graó d'imidazol fins a 300 mM 5. Diàlisi contra el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20 % glicerol
<p>Figura 4.27. Comparativa entre els protocols de purificació de GT-MG517 a partir dels diferents tampons de solubilització.</p>	

A més, per tal de raonar quin d'ells proporciona GT-MG517 en unes condicions millors per a la realització d'estudis cinètics, es recullen a la Taula 4.16 les consideracions a tenir en compte derivades de cada protocol.

Taula 4.16. Característiques de les mostres de GT-MG517 obtingudes en funció del protocol.

GT-MG517	Triton x-100	CHAPS
Detergent	Només en l'extracció, s'elimina durant IMAC	Només en l'extracció, s'elimina durant IMAC
Concentració	Per centricon s'arriba a un màxim de 2 mg/mL, després precipita	Eluïda amb gradient: Per centricon precipita molt ràpid, concentració < 1 mg/mL Eluïda amb graó: Directament concentració elevada, màxim 5 mg/mL
Puresa	2 impureses importants: GroEL i peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa No separables per gel-filtració	Impureses minoritàries i productes de degradació No separables per gel-filtració
Formació d'agregats	Sí (PM entre 300 i 125 kDa)	Sí (PM entre 200 i 65 kDa)

A part de la informació anterior i ja que l'objectiu de la purificació és l'estudi cinètic de la glicosiltransferasa, es pretén establir de forma prèvia si el procés de purificació de l'enzim influeix en la seva activitat específica. Així, es preparen mostres de GT-MG517 segons els dos procediments descrits a la Figura 4.27 i, mitjançant l'assaig radiomètric descrit al Capítol 5 "Estudi cinètic de l'activitat enzimàtica de GT-MG517" de la present tesi, se n'avalua l'activitat.

Taula 4.17. Activitat específica de GT-MG517 en funció del protocol.

	Triton x-100	CHAPS
Activitat específica (U/mg GT-MG517)	1.35 ± 0.05	1.28 ± 0.07
Condicions de reacció: 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl ₂ , 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG, 12.5 mM DOPG, 1 mM UDP- ¹⁴ C-Gal, GT-MG517 = 0.23 – 1.13 µM i T _{reacció} = 35 °C.		

A la Taula 4.17 es presenta l'activitat específica de GT-MG517 segons el protocol de purificació. Es demostra que aquest no influeix en el valor que s'obté, tal com és esperable.

La unió d'aquesta última consideració amb les esmentades en la Taula 4.16 permet concloure que el millor mecanisme d'extracció de GT-MG517 de les membranes d'*E.coli* i posterior purificació és aquell en el qual el CHAPS és el detergent emprat. D'una banda, permet obtenir la proteïna amb una concentració més elevada, si bé en aquest punt es podria argumentar a favor de l'ús del Triton x-100 que aquest procediment no s'ha provat experimentalment amb aquest detergent. De l'altra, genera mostres finals amb un nombre d'impureses menor. De fet, en les mostres de CHAPS, la glicosiltransferasa representa sovint entre un 90 i un 95 % del total de proteïnes, mentre que en les mostres de Triton x-100 el percentatge corresponent a GT-MG517 és menor. Finalment, tot i que ambdós detergents creen agregats solubles de proteïna, els quals no són separables per gel-filtració, en les mostres de CHAPS la seva mida és sensiblement inferior. En aquest punt cal recordar, però, que mostres de GT-MG517 solubilitzada amb Triton x-100 i on aquest s'ha canviat per un detergent de tipus alquil glicòsid com el OG, sí que contenen el monòmer de la glicosiltransferasa. Per tant, podria resultar interessant aprofundir més en l'ús d'aquest detergent.

Així doncs, s'estableix el protocol d'extracció amb CHAPS recollit a la Figura 4.27 com a estàndard per a la purificació de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* amb l'objectiu de la realització de l'estudi cinètic de la proteïna, el qual es presenta en el capítol següent.

Part II

Capítol 5: Estudi cinètic de l'activitat enzimàtica de GT-MG517

5 Estudi cinètic de l'activitat enzimàtica de GT-MG517

5.1 Introducció

Existeixen a la bibliografia diversos estudis cinètics sobre diferents glicosiltransferases involucrades en la síntesi de glicolípids, com és el cas de la glicosiltransferasa en estudi en el present treball, GT-MG517.

Els galactolípids són els principals lípids estructurals de les membranes de cloroplast en les cèl·lules de plantes. De fet, poden arribar a representar el 80 % del total de lípids i la seva presència s'associa al procés de la fotosíntesi [Dörmann, P. *et al*, 1999]. Es coneix que aquests compostos es troben associats a complexos proteics involucrats en el procés de transferència electrònica fonamental en l'esmentada fotosíntesi i sembla que podrien ser els responsables del seu plegament i estabilitat [Hölzl, G. *et al*, 2005a]. Per tant, no és estrany que la primera glicosiltransferasa en ser clonada fos la monogalactosildiacilglicerol sintasa de cogombre, la qual catalitza la formació de MGDG (monogalactosildiacilglicerol) [Shimajima, M. *et al*, 1997]. Aquest enzim, classificat dins de la família 28 de la base de dades CAZy de glicosiltransferases [Hölzl, G. i Dörmann, P., 2007] utilitza UDP-Gal com a sucre donador i actua mitjançant un mecanisme d'inversió de configuració del sucre quan aquest és transferit al substrat acceptor DAG (diacilglicerol).

Altres MGDG sintases d'origen vegetal estudiades són la de cloroplast d'espinaç [Covés, J. *et al*, 1986; Covés, J. *et al*, 1988; Maréchal, E. *et al*, 1994] i la d'*Arabidopsis thaliana* [Jorasch, P. *et al*, 2000]. Els treballs sobre l'enzim d'espinaç posen de manifest el requeriment d'un entorn lipídic per tal que la glicosiltransferasa aïllada recuperi la seva activitat, obtenint-se valors òptims amb de l'addició del lípid aniònic PG (fosfatidilglicerol) a les mescles que contenen un detergent i el substrat acceptor (DAG). També es determina l'existència de dos llocs d'unió de substrat independents, el del donador UDP-Gal i el de l'esmentat acceptor DAG.

Es coneix que les cèl·lules vegetals contenen tres gens diferents que codifiquen per MGDG sintases, tot i que en condicions normals la major part del MGDG dels cloroplasts prové de l'acció d'un únic enzim, MGD1. El segon galactolípid en importància present en l'esmentat òrganul vegetal és el DGDG (digalactosildiacilglicerol). En *Arabidopsis thaliana* s'han descrit dos gens que codifiquen per DGDG sintases funcionals, els anomenats DGD1 [Dörmann, P. *et al*, 1999] i DGD2 [Kelly, A.A. i Dörmann, P., 2002]. Ambdós són glicosiltransferases UDP-Gal-dependents que pertanyen a la família GT4 del CAZy i la seva especificitat per l'enllaç glicosídic és $\alpha(1\rightarrow6)$. DGD1 és la responsable principal de la síntesi del DGDG en condicions de creixement normal de la planta, mentre que DGD2 només s'activa quan la ruta de la primera es troba bloquejada. L'expressió d'ambdós gens, però, s'activa de forma molt important sota condicions de manca de fosfat per la planta, ja que els glicolípids actuen com a substituïts dels fosfolípids en aquesta situació. Sembla que existeix un tercer enzim capaç de sintetitzar digalactolípids en *Arabidopsis thaliana*, tot i que els estudis realitzats defensen la hipòtesi que es tracta d'una glicosiltransferasa processiva que en comptes d'utilitzar UDP-Gal com a donador, incorpora molècules de galactosa a partir d'una molècula de MGDG [Heemskerk, J. *et al*, 1990; Xu, C. *et al*, 2003]. De tota manera, encara no es disposa d'una descripció acurada de les característiques d'aquest enzim, el qual podria produir també tri i tetragalactolípids.

La MGDG sintasa de cogombre presenta homologia de seqüència amb dues glicosiltransferases responsables de la síntesi de glicolípids en dos bacteris: *Bacillus subtilis* [Jorasch, P. *et al*, 1998] i *Staphylococcus aureus* [Jorasch, P. *et al*, 2000]. La funció dels glicolípids en aquests organismes és la de servir com a punt d'ancoratge a la membrana dels àcids lipoteicoics, els quals tenen un paper vital en el creixement i la fisiologia dels bacteris Gram-positiu, ja que es troben involucrats en l'activitat de les autolisines, la unió de cofactors metàl·lics a enzims i en les propietats electromecàniques de la paret cel·lular [Kiriukhin, M. *et al*, 2001]. En ambdós casos es tracta d'enzims processius, pertanyents a la família GT28 del CAZy, i capaços de transferir de forma seqüencial diverses unitats de glucosa a partir d'UDP-Glc com a molècula donadora tot formant un enllaç $\beta(1\rightarrow6)$ entre els sacàrids. La glicosiltransferasa de *Bacillus subtilis* pot produir oligoglucolípids *in vitro* unint fins a quatre unitats de glucosa, mentre que la de *Staphylococcus aureus* només en polimeritza fins a tres. Cal remarcar que la processivitat d'aquests enzims implica que la primera glucosa es transfereix sobre un substrat de caràcter hidrofòbic com és el DAG, mentre que les següents glicosilacions tenen lloc sobre residus glucosil hidrofílics. La qüestió sobre l'existència de dos centres d'unió per acceptor en aquest tipus d'enzim processiu es manté oberta.

Les dues glicosiltransferases processives descrites en el paràgraf anterior no són úniques dins dels bacteris. Els genomes d'*Agrobacterium tumefaciens* i *Mesorhizobium loti* contenen un gen descrit com a glucosilceramida sintasa (Gcs), el qual en realitat es tracta d'una glicosiltransferasa capaç de la síntesi de glicolípids [Hölzl, G. *et al*, 2005b]. Ambdues glicosiltransferases formen part de la família GT21 del CAZy, en la qual s'engloben també totes les Gcs d'organismes eucariotes. Ara bé, si bé aquestes utilitzen com a donador UDP-Glc i com a acceptor ceramida, les Gcs bacterianes presenten una destacable promiscuïtat tant a nivell de donador, on poden usar UDP-Glc i UDP-Gal però prefereixen aquest últim, com a nivell d'acceptor, on poden usar ceramida però prefereixen DAG. La tercera diferència respecte les Gcs eucariotes és la processivitat, ja que aquestes únicament produeixen glucoceramides amb una unitat de glucosa, mentre que les glicosiltransferases de *A. tumefaciens* i *M. loti* són capaces de sintetitzar diglicosil i triglicosildiacylglicerols amb una connectivitat entre sacàrids $\beta(1\rightarrow6)$, igual que les glicosiltransferases processives de *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*.

Ara bé, no totes les glicosiltransferases bacterianes que produeixen glicolípids són processives. Un exemple d'aquest fet són les α -glicosiltransferases de *Deinococcus radiodurans* i *Thermotoga maritima*, les quals catalitzen la formació de monoglucosildiacylglicerol (MGlcDAG). Ambdós enzims es troben classificats dins la família de les GT4 del CAZy. *Chloroflexus aurantiacus* és un altre bacteri que disposa d'una glicosiltransferasa no processiva que sintetitza, en aquest cas, MGDG. Aquesta es tracta d'una β -galactosiltransferasa i pertany a la família GT28 del CAZy. Ara bé, aquest organisme sí que expressa una glicosiltransferasa processiva, també pertanyent a la família GT28. Es tracta d'una β -glicosiltransferasa que pot acceptar tant DAG com MGlcDG o MGDG. L'especificitat de l'enllaç entre unitats sacarídiques és com el de les altres glicosiltransferases processives bacterianes, és a dir, $\beta(1\rightarrow6)$ [Hölzl, G., *et al*, 2005a].

Segurament els estudis més remarcables en el marc d'aquesta tesi són els realitzats pel grup de Åke Wieslander a la Universitat d'Umea (Suècia). L'objecte dels seus treballs són els glicolípids de membrana de l'espècie de micoplasma *Acholeplasma laidlawii*. En aquest organisme, les propietats físiques de la membrana (equilibri entre fases lamelar/no lamel·lar i radi de curvatura) es mantenen mitjançant la regulació metabòlica de la síntesi dels seus

dos principals glicolípids: el monoglucosildiacilglicerol (MGlcDAG) i el diglucosildiacilglicerol (DGlcDAG). El primer compost és una molècula la presència de la qual en una membrana té tendència a generar fases no lamel·lars, mentre que el segon, és propens a la formació de fases lamel·lars [Karlsson, O. *et al*, 1994]. Contràriament al que ocorre en *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*, *Acholeplasma* posseeix dos enzims independents encarregats de la síntesi dels dos glicolípids. Aquests són respectivament la UDP-glucosa:1,2-diacilglicerol 3-glucosiltransferasa (MGlcDAG sintasa) i la 1,2-diacilglicerol-3- α -glucosa(1 \rightarrow 2)- α -glucosiltransferasa (DGlcDAG sintasa), els quals es classifiquen dins de la família GT4 del CAZy. Ambdós enzims es troben units a la membrana del micoplasma. Aquesta localització permet afirmar que la regulació del balanç entre el MGlcDAG i el DGlcDAG present en cada moment a la membrana del microorganisme es realitza a nivell de l'activitat enzimàtica, considerant que els enzims són sensibles a les característiques estructurals i dinàmiques de la membrana que els suporta i de la qual en sintetitzen els components [Dahlqvist, A. *et al*, 1995]. L'activitat enzimàtica de la MGlcDG sintasa d'*Acholeplasma* presenta una dependència cooperativa respecte la presència de lípids aniònics com el DOPG (dioleilfosfatidilglicerol), comportament semblant al descrit per a l'enzim que sintetitza MGDG en cloroplast d'espinaç. En aquest cas, però, es demostra que la influència del DOPG es produeix sobre la velocitat enzimàtica i no sobre la unió substrat-enzim [Karlsson, O. *et al*, 1997]. D'altra banda, el comportament respecte el substrat donador UDP-Glc és del tipus Michaelis-Menten, mentre que el substrat acceptor DOG activa l'enzim a través d'un mecanisme cooperatiu. Pel que fa a l'activitat enzimàtica de la DGlcDG sintasa, cal dir que presenta unes característiques molt semblants a les de la MGlcDG sintasa, ja que també mostra una dependència cooperativa davant DOPG, un comportament tipus Michaelis-Menten respecte UDP-Glc i l'activació cooperativa de l'enzim per part del substrat acceptor MGlcDG. Ara bé, cal dir que l'activació de la DGlcDG sintasa per part del lípid aniònic DOPG és més important que la que exerceix el substrat acceptor de l'enzim sobre aquest [Vikström, S. *et al*, 1999].

Es coneix que *in vivo* la síntesi dels dos glicolípids principals d'*Acholeplasma laidlawii* es troba molt influenciada per la mida de les cadenes d'àcid gras de l'acceptor i pel grau d'insaturacions presents en la matriu lipídica de la membrana [Dahlqvist, A. *et al*, 1995; Rilfors, L. *et al*, 1993]. *In vitro*, amb els enzims parcialment purificats, la síntesi del MGlcDG depèn de la presència de certa densitat de càrrega aportada per fosfolípids aniònics, mentre que la del DGlcDG depèn més de la identitat d'aquests fosfolípids, ja que s'observa un important requeriment de DOPG. D'altra banda, ja que la DGlcDG sintasa és molt sensible al tipus de lípids presents a la bicapa lipídica i la seva activitat es veu estimulada per molècules de caràcter no lamel·lar, sembla que és aquest enzim i no la MGlcDG sintasa el que regula l'equilibri lamel·lar-no lamel·lar de la bicapa i la seva curvatura [Vikström, S. *et al*, 1999].

Més recentment el grup de Wieslander ha publicat un treball on es realitza un estudi sobre l'enzim encarregat de la síntesi dels glicolípids de membrana de *Mycoplasma pneumoniae*, el parent més pròxim de *Mycoplasma genitalium*. L'anàlisi dels glicolípids sintetitzats per extractes cel·lulars del microorganisme revela la presència de compostos que contenen únicament galactosa. Ara bé, la seva capacitat d'incorporar aquest sucre *in vivo* és limitada, ja sigui perquè no disposa dels mecanismes necessaris per introduir UDP-Gal a la cèl·lula o bé perquè utilitza UDP-Glc que transforma via epimerització en UDP-Gal. Com a substrat acceptor, els extractes cel·lulars de *Mycoplasma pneumoniae* poden utilitzar DAG o ceramida. A partir d'assajos *in vitro*, l'estudi revela que el micoplasma disposa d'una glicosiltransferasa encarregada de la síntesi de la major part dels glicolípids que s'observen *in vivo*. Aquest enzim, MPN483, és processiu i promiscu. Quan s'expressa en *E. coli*, és capaç de transferir fins a tres unitats de

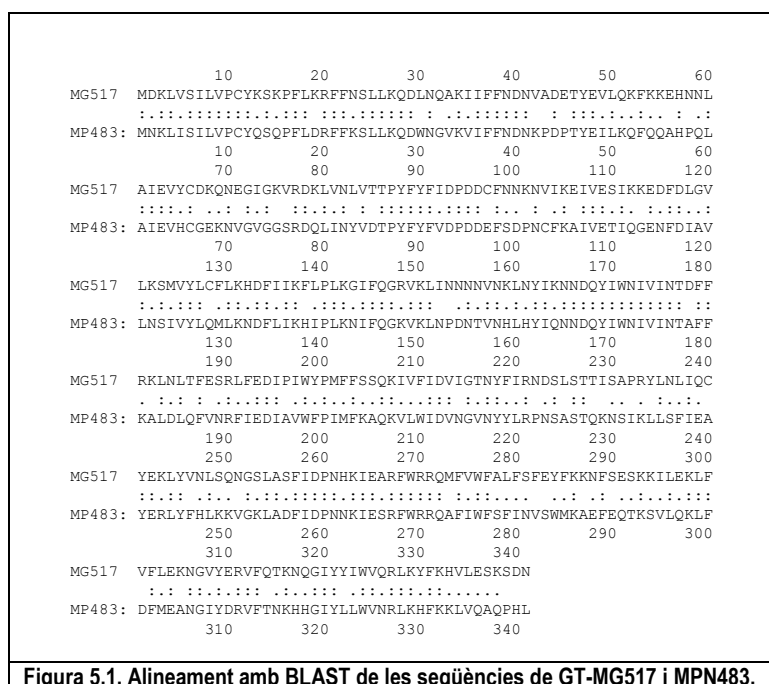
galactosa a DAG o ceramida emprant UDP-Gal com a molècula donadora, ja que *in vitro* aquest és el seu substrat preferit. L'enllaç que estableix entre unitats sacarídiques és $\beta(1\rightarrow6)$, igual que les glicosiltransferases esmentades anteriorment de *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Ara bé, si aquestes es classificaven dins la família GT28 del CAZy, la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae* s'ubica dins la família GT2. Aquest fet també la diferencia dels enzims d'*Acholeplasma*, els quals es classifiquen dins la família GT4. En aquest cas, però, l'especificitat de l'enllaç entre unitats glucosídiques és diferent, ja que en *Acholeplasma* l'enllaç és $\alpha(1\rightarrow2)$. Tot i això, ambdues glicosiltransferases, la de *Mycoplasma pneumoniae* i la d'*Acholeplasma*, comparteixen diverses característiques, com ara una forta influència de l'entorn lipídic sobre l'activitat enzimàtica i sobretot, una important activació per part del lípid aniònic PG. Quelcom comú també és la seva interacció amb la membrana. En el cas de MPN483 les eines bioinformàtiques no descriuen dominis transmembrana, si bé la seqüència proteica presenta diverses hèlix amfipàtiques a la zona C-terminal, que podrien representar punts d'associació amb la membrana. Aquesta mateixa zona C-terminal és molt rica en aminoàcids carregats positivament, els quals són responsables de l'elevat punt isoelectríc de la proteïna [Rosén Klement, M. *et al.*, 2007].

Taula 5.1. Resum de les glicosiltransferases productores de glicolípidis existents en bibliografia.

Organisme	Família GT	Producte	Donador	Acceptador	Enllaç	Característiques
Cogombre Espinac <i>Arabidopsis thaliana</i>	GT28	MGDG	UDP-Gal	DAG	β	Activació per lípids aniònics
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GT4	DGDG	UDP-Gal	MGDG	$\alpha(1\rightarrow6)$	-
<i>Bacillus subtilis</i>	GT28	MGlcDG DGlcDG TGlcDG TeGlcDG	UDP-Glc	DAG MGlcDG DGlcDG TGlcDG	$\beta(1\rightarrow6)$	Processiu
<i>Staphylococcus aureus</i>	GT28	MGlcDG DGlcDG TGlcDG	UDP-Glc	DAG MGlcDG DGlcDG	$\beta(1\rightarrow6)$	Processiu
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Mesorhizobium loti</i>	GT21	MGDG DGDG TGDG	UDP-Gal UDP-Glc	DAG ceramida	$\beta(1\rightarrow6)$	Processiu
<i>Deinococcus radiodurans</i> <i>Thermotoga maritima</i>	GT4	MGlcDG	UDP-Glc	DAG	α	-
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	GT28	MGDG	UDP-Gal	DAG	β	-
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	GT28	MGlcDG DGlcDG	UDP-Glc	DAG MGlcDG	$\beta(1\rightarrow6)$	Processiu
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	GT4	MGlcDG	UDP-Glc	DAG	α	Activació per lípids aniònics
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	GT4	DGlcDG	UDP-Glc	MGlcDG	$\alpha(1\rightarrow2)$	Activació per lípids aniònics
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	GT2	MGDG DGDG TGDG	UDP-Gal UDP-Glc	DAG ceramida	$\beta(1\rightarrow6)$	Processiu Activació per lípids aniònics

De totes les glicosiltransferases que es troben a la bibliografia i que estan involucrades en la síntesi de glicolípidis (se'n presenta un resum a la Taula 5.1) la més pròxima filogenèticament a GT-MG517 és la de *Mycoplasma pneumoniae*. Els productes de síntesi de GT-MG517 són MGlcDG, DGlcDG i possiblement TGlcDG, tot i que aquest últim producte no s'ha aïllat [Andrés E.; Tesi Doctoral, 2007]. Per tant, es descriu l'enzim com a processiu, entenent

com a tal que és capaç de transferir en un primer pas un residu glucosil a un acceptor lipídic i en passos posteriors a un glicolipid amb una cadena creixent d'unitats sacarídiques, ja que de moment no s'ha pogut demostrar que la successiva addició de sucres tingui lloc sense dissociació del complex enzim-acceptor. L'enllaç que genera entre les esmentades unitats glicosídiques és $\beta(1\rightarrow6)$. També es coneix que la seva activitat enzimàtica es troba associada a la membrana, tant *in vivo*, en extractes de *Mycoplasma genitalium*, com quan la proteïna s'expressa en *E. coli* de forma recombinant. Tot i això, no es prediuen zones transmembrana per a GT-MG517 amb cap de les eines bioinformàtiques provades. Ara bé, la zona C-terminal presenta, igual que ocorre amb MPN483, hèlix amfipàtiques típiques de proteïnes associades a membrana i també un elevat nombre d'aminoàcids carregats positivament, els quals es proposen com a punts d'interacció amb els fosfolípids. Un altre punt en comú amb MPN483 és la pertinença a la família GT2 de glicosiltransferases del CAZy. Les seqüències d'ambdues proteïnes presenten una similitud del 86 % i quan s'alineen mitjançant un BLAST, una identitat del 56 % (Figura 5.1).



Cal dir que l'estudi *in vitro* de MPN483 es realitza sobre extractes cel·lulars d'*E. coli* que expressen l'enzim, però no sobre proteïna pura. En aquest sentit, l'estudi cinètic que es presenta en aquest capítol va més enllà, ja que a més del treball amb extractes cel·lulars, inclou també la determinació de paràmetres cinètics de l'enzim aïllat, introduït en un sistema miscel·lar que conté lípids i un detergent.

5.2 Estudis previs: anàlisi qualitativa de l'activitat enzimàtica de GT-MG517

En una tesi realitzada al grup prèvia al present treball es va desenvolupar un assaig que permetia determinar de forma qualitativa l'activitat enzimàtica de GT-MG517 [Andrés, E.; Tesi doctoral, 2007]. L'esmentat assaig està basat en les condicions de reacció emprades pel grup de Wieslander en els seus treballs sobre *Acholeplasma laidlawii* [Dahlqvist, A. *et al*, 1992]. Cal dir que el fet que el substrat acceptor de la reacció enzimàtica (DOG) presenti un

caràcter lipídic i, per tant, la seva solubilitat en matrius aquoses sigui baixa, planteja la necessitat d'usar un detergent com a agent emulsionador.

En el cas de l'assaig qualitatiu desenvolupat en el grup, aquest agent és el detergent aniònic SDS (dodecilsulfat sòdic). Es coneix que l'SDS en petites quantitats és capaç d'activar la síntesi de MGlcDG en experiments *in vitro* sobre membranes intactes d' *Acholeplasma laidlawii* [Dahlqvist, A. *et al*, 1992]. Segurament aquesta capacitat es troba relacionada amb el seu cap polar de naturalesa aniònica, ja que tal com s'ha descrit anteriorment, la MGlcDG sintasa d' *Acholeplasma* requereix per a la seva activitat la càrrega que li aporten fosfolípids aniònics com el PG. Ara bé, quan l'SDS s'empra per a solubilitzar proteïnes de membrana, aquestes perden la seva activitat enzimàtica. Per tant, concentracions elevades del detergent no són adequades per a treballar en un assaig enzimàtic. Així doncs, les condicions de reacció establertes són les que es mostren a la Taula 5.2.

Taula 5.2. Condicions de reacció estàndards de l'assaig qualitatiu per l'activitat de GT-MG517

Compost	Concentració
Tris-malat pH 8	120 mM
MgCl ₂	20 mM
UDP-Glc (donador)	5 mM
DOG / SDS (acceptor)	1 mM / 0.2 mM
T _{reacció}	35 °C
t _{reacció}	O/N

Es tracta d'un assaig qualitatiu, ja que els productes generats al llarg de la reacció enzimàtica es visualitzen mitjançant Cromatografia de Capa Fina (TLC – *Thin Layer Chromatography*), tècnica que per si mateixa no permet una quantificació directa. Per tal de separar els glicolípid produïts enzimàticament dels substrats que no han reaccionat, s'utilitza la naturalesa hidrofòbica dels primers i se separen mitjançant una extracció líquid-líquid amb una mescla orgànica de cloroform/MeOH. El protocol complet es descriu en el punt 10.2.2 de la *Part Experimental*.

Els resultats que es presenten a continuació s'han obtingut a partir de l'aplicació de l'assaig qualitatiu.

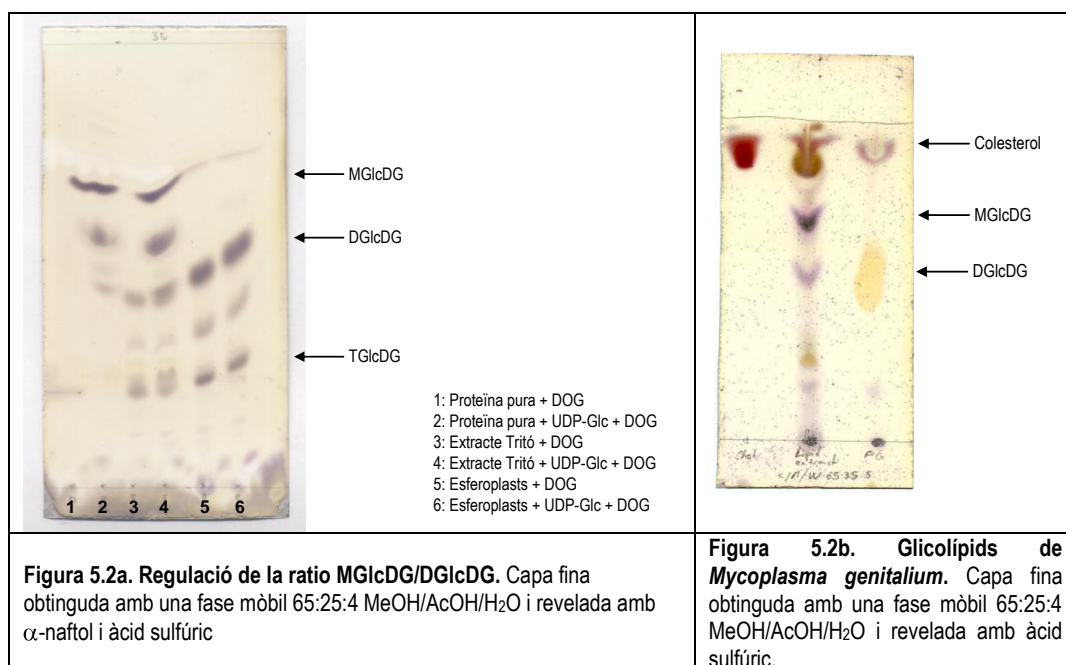
5.2.1 Regulació de l'activitat enzimàtica de GT-MG517 per part de la membrana

Un bon funcionament de la membrana plasmàtica requereix que les seves propietats físiques (cristal·linitat, radi de curvatura i càrrega) siguin les adequades. Per això és bàsic el manteniment de l'equilibri de fases pròxim a la transició bicapa-no bicapa i una curvatura espontània gairebé constant. La forma com s'assoleixen aquestes condicions és regulant les proporcions relatives entre molècules que tenen tendència a formar fases lamel·lars, com el DGlcDG, i molècules que tendeixen a formar fases no-lamel·lars, com el MGlcDG. Així doncs, l'entorn lipídic de les glicosiltransferases que sintetitzen aquests glicolípid, com és el cas de GT-MG517, influeix de forma molt important la seva activitat, ja que determina l'esmentada ratio MGlcDG/DGlcDG necessària en cada moment.

Per tal de demostrar aquesta dependència respecte la composició lipídica de l'entorn per part de GT-MG517, s'han analitzat els glicolípid que l'enzim produeix en dues condicions diferents. En la primera d'elles, la font enzimàtica és proteïna purificada segons el mètode descrit en el punt 4.4.2 del Capítol 4 "*Expressió i purificació de GT-MG517*", en

el qual s'usa Triton x-100 per tal de solubilitzar les proteïnes de membrana, seguit d'una cromatografia d'afinitat per tal de separar la proteïna d'interès de la resta de proteïnes d'*E.coli* també solubilitzades pel tampó d'extracció i el tampó final en el qual es troba l'enzim és 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100 i 5 % glicerol. En la segona condició, la font enzimàtica consisteix en esferoplasts obtinguts a partir de cèl·lules d'*E.coli* que expressen GT-MG517. La diferència entre les dues fonts enzimàtiques és clara, ja que en el cas dels esferoplasts, la glicosiltransferasa se situa a la membrana i, per tant, disposa d'un entorn lipídic determinat; mentre que quan s'usa proteïna aïllada i extreta de la membrana amb un detergent com el Triton x-100, s'ha demostrat que l'enzim es troba lliure de lípids (Figura 4.10). A més, s'ha inclòs una tercera reacció on la font enzimàtica és l'extracte proteic provinent de l'extracció amb Triton x-100 que, a més de GT-MG517, conté totes les altres proteïnes d'*E.coli* solubilitzades pel tampó, però cap dels lípids de membrana.

Totes les reaccions enzimàtiques s'han realitzat en les condicions estàndard especificades en la Taula 5.2. Com a controls, s'han inclòs les corresponents reaccions sense el substrat donador UDP-Glc.



A la Figura 5.2a es presenten els resultats obtinguts. S'observa com el producte majoritari quan GT-MG517 es troba purificada (carril 2) és el MGlcDG, mentre que el mateix compost és pràcticament inexistent quan la font enzimàtica són esferoplasts (carril 6). En aquest cas, el principal glicolípid sintetitzat és DGlcDG. Sembla doncs que quan la proteïna es troba inserida a la membrana d'*E.coli*, es troba sotmesa a algun tipus de regulació que desplaça la síntesi de glicolípid cap a una molècula de caràcter més lamel·lar. Únicament l'extracció de la proteïna amb el detergent, el qual desplaça els lípids de la membrana durant el procés de solubilització, ja genera el canvi en els productes sintetitzats. Així, en les mostres on la font enzimàtica és l'extracte proteic (carril 4), ja s'observa la presència de MGlcDG, igual com ocorre quan l'enzim està del tot purificat.

Si es compara el perfil de glicolípid que s'obté quan s'expressa GT-MG517 en *E. coli* amb el de *Mycoplasma genitalium* també s'aprecien diferències, ja que el component majoritari en les membranes del microorganisme és el

MGlcDG, tal com es pot veure a la Figura 5.2b, on la relació MGlcDG/DGlcDG és més semblant a la que genera l'enzim purificat. Aquestes diferències evidencien l'existència d'una regulació enzimàtica per part de la membrana, ja sigui a nivell de les seves propietats físiques, les quals puguin influir directament sobre l'activitat de la proteïna, o a nivell d'algun dels seus components, els quals poden modular també aquesta activitat, mitjançant activació o inhibició.

Cal comentar que l'assignació del compost més polar com a TGlcDG no es realitza en base a un anàlisi de la seva estructura, com sí s'ha realitzat pel MGlcDG i DGlcDG [Andrés, E.; Tesi doctoral, 2007], sinó que està basada en l' R_f presentat en bibliografia per la mateixa molècula en un sistema cromatogràfic equivalent [Rosén Klement, M. *et al*, 2007].

5.2.2 Especificitat de l'enzim per substrat donador i substrat acceptor

Algunes de les glicosiltransferases involucrades en la síntesi de glicolípidos són molt estrictes pel que fa als substrats donadors i acceptors que poden utilitzar, mentre d'altres es descriuen com a promiscues perquè permeten l'obtenció d'un ventall més ampli de glicolípidos.

En aquest sentit i d'una manera qualitativa, s'ha analitzat l'especificitat de GT-MG517 per substrat donador, realitzant proves amb UDP-Glc i UDP-Gal, i per substrat acceptor, utilitzant DOG i ceramida. En tots els casos les reaccions s'han dut a terme en les condicions estàndards descrites a la Taula 5.2, però cal remarcar que per tal de solubilitzar la ceramida, ha estat necessari doblar la concentració de SDS, de manera que en reacció aquesta era de 0.4 mM en comptes de 0.2 mM, valor habitual quan el lípid acceptor és DOG. Com a font enzimàtica s'ha emprat proteïna purificada mitjançant cromatografia d'afinitat a partir d'un tampó d'extracció basat en el detergent Triton x-100, la qual es troba en el tampó 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100 i 5 % glicerol.

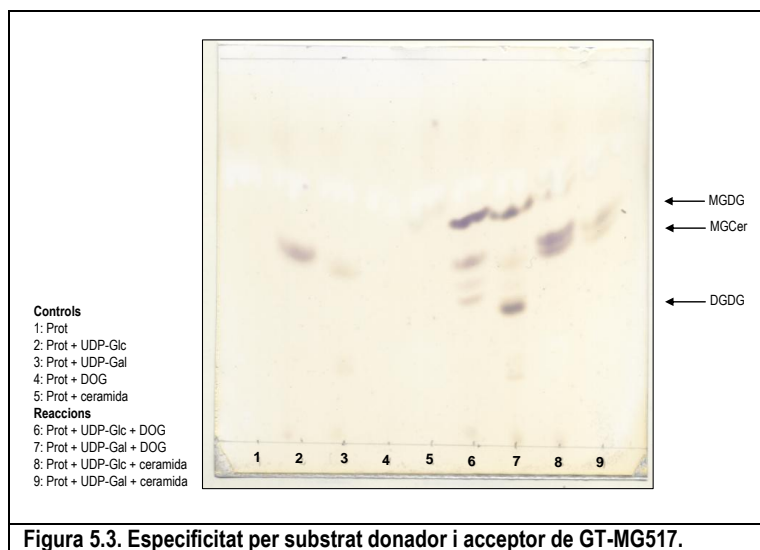


Figura 5.3. Especificitat per substrat donador i acceptor de GT-MG517.

Els resultats que s'obtenen posen de manifest que GT-MG517 pot utilitzar com a donadors tant UDP-Glc com UDP-Gal, tot i que els productes que l'enzim sintetitza en cada cas són diferents. Amb la parella UDP-Glc/DOG la

ratio MGlcDG/DGlcDG és molt favorable al primer dels glicolípid (carril 6), mentre que quan és l'UDP-Gal que actua de donador, la proporció entre ambdós compostos s'igualava de forma notable (carril 7). En el cas que el substrat acceptor sigui ceramida, pot afirmar-se que l'enzim prefereix UDP-Glc com a substrat donador i que només existeix un primer terme de glicosilació (carril 8). Es creu que el producte que apareix quan el substrat donador és UDP-Glc i no hi ha un acceptor determinat (carril 2) és el resultat de la glicosilació del Triton x-100 que forma part del tampó on es troba la proteïna purificada, el qual presenta un hidroxil lliure en la seva estructura.

Els resultats descrits demostren que GT-MG517 és capaç de glicosilar tant DOG com ceramida. La possibilitat que també pugui incorporar un sucre a l'hidroxil lliure del Triton x-100 requereix més experiments i una identificació química de l'origen de la banda que es visualitza en la TLC.

Amb els donadors i acceptors assajats es pot afirmar que el comportament de GT-MG517 és força semblant al de MPN483, la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae* descrita en la "Introducció" d'aquest capítol.

5.2.3 Requeriment de cofactor metàl·lic per l'activitat enzimàtica de GT-MG517

Es coneix que moltes glicosiltransferases necessiten de la presència d'un cofactor metàl·lic en el medi de reacció per a ser actives [Ünligil, U. i Rini, J., 2000]. Sembla que la funció de l'esmentat cofactor és la de facilitar la sortida del nucleòtid-difosfat que es genera quan l'enzim transfereix el sucre des d'un donador del tipus NDP-Gly. Els cofactors metàl·lics més típics són metalls divalents com el Mg^{2+} o el Mn^{2+} [Charnock, S. i Davies, G., 1999].

Tots els assajos d'activitat realitzats per a GT-MG517 s'han basat en la bibliografia provinent dels estudis sobre *Acholeplasma laidlawii*. Les glicosiltransferases d'aquest organisme requereixen Mg^{2+} per al seu funcionament. Per analogia, en les reaccions realitzades amb GT-MG517 s'ha treballat amb el mateix metall. És evident pels resultats obtinguts que l'enzim és funcional en presència de Mg^{2+} , però encara no s'ha demostrat que aquest sigui imprescindible per a l'observació d'activitat, ni s'ha estudiat si és l'únic metall que la proteïna pugui utilitzar.

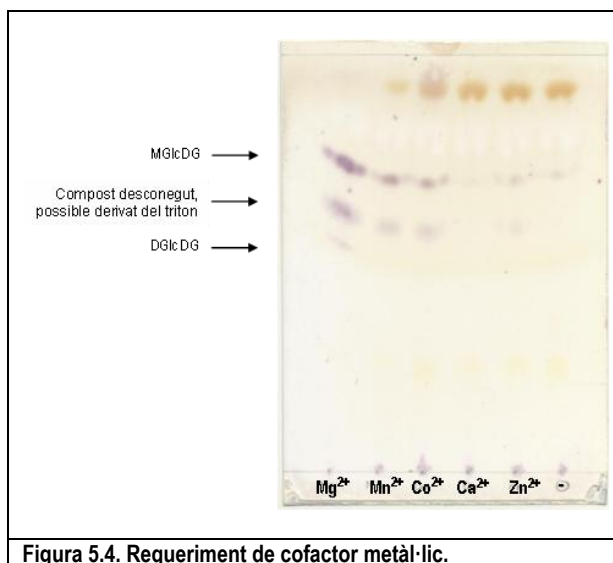


Figura 5.4. Requeriment de cofactor metàl·lic.

Utilitzant com a font enzimàtica proteïna purificada per cromatografia d'afinitat provinent d'un extracte de Triton x-100 que es troba en un tampó compost per 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100 i 5 % glicerol s'ha procedit a comprovar l'esmentat requeriment de Mg^{2+} per part de GT-MG517. També s'han provat altres metalls: Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} i Zn^{2+} . S'han emprat les condicions de reacció estàndards, però substituint el $MgCl_2$ per la corresponent sal ($MnCl_2$, $CoCl_2$, $CaCl_2$ i $ZnSO_4$), mantenint la concentració de 20 mM en reacció.

Els resultats que s'obtenen (Figura 5.4) posen de manifest que sense la presència d'un cofactor metàl·lic no hi ha producció de glicolípids (control -). D'altra banda, el metall que genera una síntesi més gran de glicolípids és el Mg^{2+} , tot i que també s'observa activitat quan el cofactor metàl·lic és Mn^{2+} o Co^{2+} , però en una quantitat molt menor segons la intensitat de les bandes de la TLC.

5.3 Anàlisi quantitativa: disseny i desenvolupament d'un assaig radiomètric

La reacció enzimàtica que catalitza GT-MG517 és la que es presenta a la Figura 5.5.

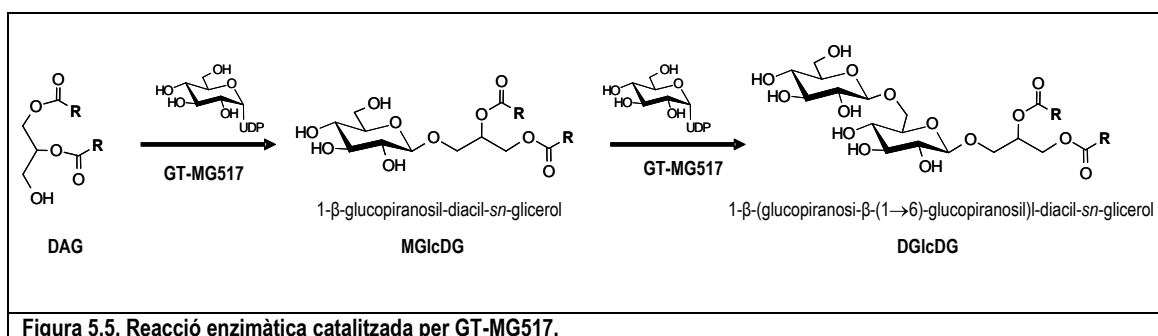
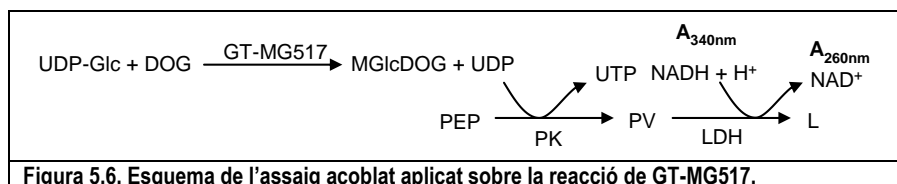


Figura 5.5. Reacció enzimàtica catalitzada per GT-MG517.

Així doncs, l'estudi de l'activitat glicosiltransferasa de l'enzim podria fer-se monitoritzant el consum tant del donador UDP-Glc com de l'acceptor DAG, però també seguint la formació dels dos glicolípids o l'alliberament d'UDP. En qualsevol cas no existeix una propietat diferencial mesurable directament per un mètode espectrofotomètric, la qual permetria realitzar el seguiment de la reacció d'una forma continua. Aquest fet és general per a la major part de reaccions glicosiltransferasa. És per això que els assajos d'activitat que existeixen són tots discontinus (mètodes radiomètrics i mètodes cromatogràfics), o bé acoblen una segona reacció indicadora que en permet el seguiment en continu (mètodes espectrofotomètrics).

Pel que fa als esmentats mètodes espectrofotomètrics, acoblen a la reacció glicosiltransferasa dues reaccions enzimàtiques més que consumeixen UDP i provoquen un canvi d'absorbància mesurable a 340 nm. La primera d'aquestes reaccions és la transformació de fosfoenolpiruvat (PEP) en piruvat (PV) per la piruvat quinasa (PK), reacció que consumeix UDP. La segona reacció és el pas del piruvat a lactat (L) mitjançant la lactat deshidrogenasa (LDH). En aquesta reacció es consumeix NADH, el qual absorbeix a 340 nm. Aquest fet propicia un seguiment en continu de la seva desaparició que en últim terme s'associa directament a la reacció de glicosilació. Un esquema de l'assaig acoblat a la reacció de GT-MG517 es presenta a la Figura 5.6.



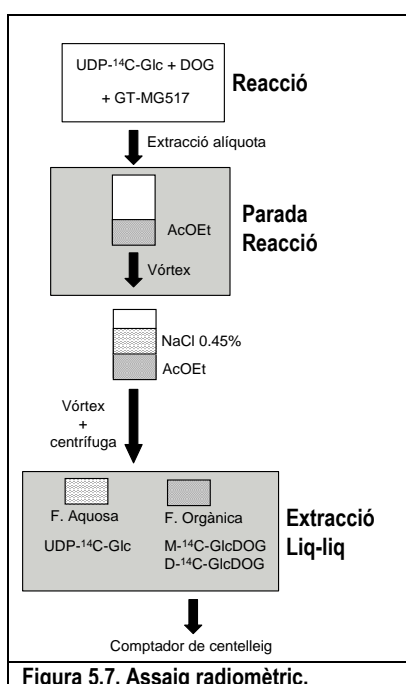
Cal dir que els intents d'aplicar l'esmentada metodologia a la reacció de GT-MG517 no han funcionat. El motiu principal es troba en la naturalesa lipídica del substrat acceptor i dels productes. La necessitat de treballar amb un detergent que actuï com a agent emulsionant i permeti la dissolució de l'acceptor i els productes en el medi de reacció aquós genera miscel·les que afecten l'absorbància a 340 nm. Així doncs, el seguiment de la reacció no és possible mitjançant aquest mètode.

En el cas dels mètodes cromatogràfics i, més concretament, electroforètics, la base de la seva aplicació en el seguiment de reaccions glicosiltransferasa es troba en marcar, preferiblement mitjançant derivatització amb un cromòfor, els reactius i que d'aquesta forma, la marca s'incorpori als productes. L'excés de reactius marcat se separa i es quantifica. L'electroforesi capil·lar proporciona una gran resolució i sensibilitat, especialment si la detecció es realitza per fluorescència. Per aquest motiu, una forma habitual d'aplicar l'electroforesi capil·lar a les reaccions de glicosilació és el marcatge de l'acceptor de l'esmentada reacció amb un cromòfor que a la vegada proporcioni càrrega a la molècula per permetre'n la separació.

En el grup s'ha desenvolupat un assaig per electroforesi capil·lar destinat a l'estudi d'una glicosiltransferasa, la α -1,3-galactosiltransferasa [Monegal, A. *et al*, 2005]. Aquest enzim és el responsable de la síntesi del disacàrid terminal Gal- α -1,3-Gal de l'antigen majoritari en els xenotransplants, l'anomenat epítot α Gal. El seguiment de la reacció mitjançant electroforesi capil·lar es realitza de forma discontinua mitjançant la derivatització del producte format amb l'àcid 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfònic (ANTS). Aquesta molècula, a més de proporcionar càrrega al sucre en un marge ampli de pH, en permet la seva detecció per absorció a l'UV. La incorporació de l'ANTS al producte de la reacció es fa a partir de l'extrem reductor del disacàrid. L'aplicació del mateix assaig a la reacció catalitzada per GT-MG517 ha resultat impossible, donada la manca d'un extrem reductor en el producte format, el qual fes possible la derivatització amb ANTS.

Així doncs, s'ha optat pel disseny i desenvolupament d'un assaig radiomètric aplicable a la reacció de glicosilació catalitzada per GT-MG517. Per fer-ho ha estat necessari tenir en compte dues particularitats de l'esmentada reacció, ja considerades en desenvolupar l'assaig qualitatiu per TLC. D'una banda, la naturalesa lipídica del substrat acceptor i dels productes formats; i de l'altra, el fet que GT-MG517 és un enzim associat a la membrana i, per tant, posseeix zones altament hidrofòbiques que requereixen un entorn apropiat que mantingui la proteïna en un estat funcional. Així doncs, és necessari un medi de reacció que permeti a la vegada la convivència del substrat donador hidrofílic i de la resta de components hidrofòbics, enzim inclòs. A més, aquest medi ha de ser homogeni, ja que per tal que tingui lloc la reacció, substrats i enzim han de poder entrar en contacte i això no ocorre si es troben en fases diferents. La solució per aconseguir aquestes condicions es troba en l'ús de sistemes de miscel·les mixtes, en les quals s'inclou un detergent, la proteïna i el substrat acceptor lipídic i on s'incorporen els productes a mesura que avança la reacció.

La marca radioactiva necessària per quantificar el progrés de la reacció que catalitza GT-MG517 s'incorpora mitjançant substrats donadors marcats amb ^{14}C en tots els carbonis de la part del sucre, ja sigui glucosa o galactosa (UDP- ^{14}C -Glc o UDP- ^{14}C -Gal). Per tal de separar el reactiu en excés que no s'incorpora als glicolípids, s'aprofita la naturalesa hidrofòbica d'aquestes molècules i es realitza una extracció líquid-líquid amb un dissolvent orgànic. D'aquesta manera, la marca no incorporada als productes de la reacció enzimàtica roman a la fase aquosa, mentre aquella que forma part dels glicolípids de nova síntesi passa a la fase orgànica i es comptabilitza mitjançant un comptador de centelleig [Shimajima, M. *et al*, 1997]. A la Figura 5.7 es presenta un esquema del procediment dissenyat, en base al qual pot dir-se que l'assaig radiomètric permet seguir l'evolució de la reacció enzimàtica de forma discontinua. Cal tenir en compte, però, que l'assaig només quantifica radioactivitat incorporada a la fracció lipídica. Això implica que no es possible distingir entre la formació del MGlcDG i del DGlcDG, sinó que es comptabilitzen ambdós compostos conjuntament.



Ha estat necessària l'optimització de diversos aspectes de l'assaig radiomètric, com ara la relació entre donador radioactiu/no radioactiu present en les reaccions, el temps de comptatge i el número d'extraccions necessàries per assegurar que la fase orgànica es troba lliure del donador en excés que no ha reaccionat.

5.3.1 Obtenció de les rectes patró dels substrats donadors i establiment del temps de comptatge òptim.

És necessari disposar de rectes patró que permetin relacionar la radioactivitat incorporada als productes formats amb la quantitat de substrat donador consumit. Aquestes rectes patró s'elaboren a partir de diferents dilucions d'una dissolució stock concentrada de donador, ja sigui UDP-Glc o UDP-Gal. Cal dir que per tal de cobrir tot el rang de concentracions de donadors amb les quals es treballarà i mantenir-se dins del marge de linealitat del mètode, s'ha treballat amb dues relacions diferents de la ratio radioactiu/no radioactiu: 1/200 i 1/50 (en ambdós casos la ratio és molar, és a dir, mols de donador radioactiu enfront a de mols de donador no radioactiu). La primera de les ratios és

l'emprada de forma habitual, mentre que la segona s'ha usat quan la concentració de donador en reacció és igual o inferior a 50 μM .

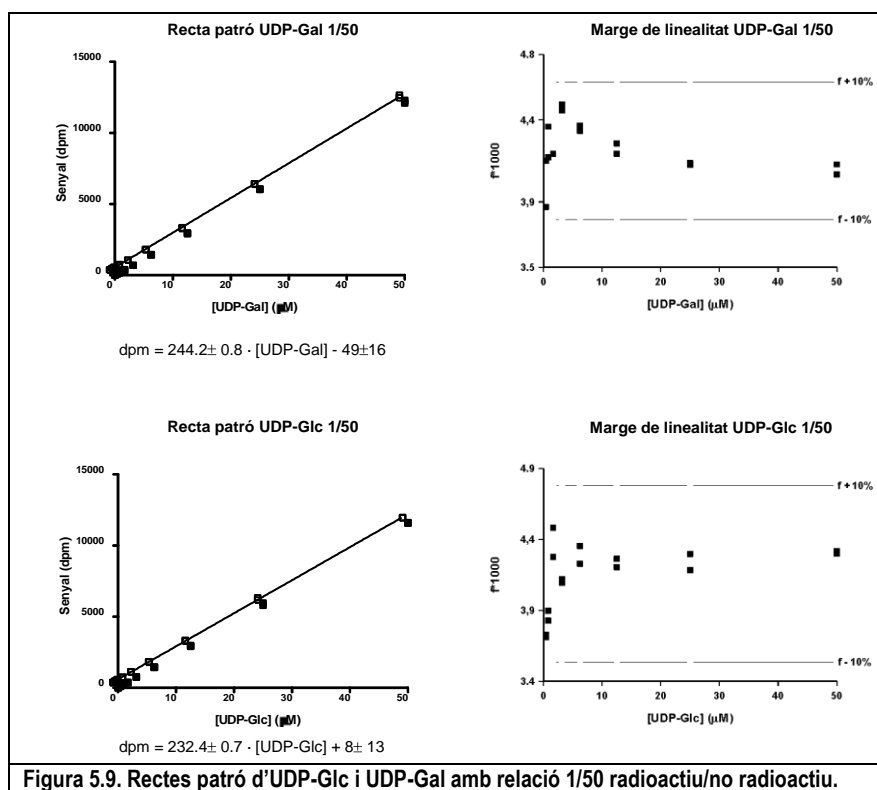
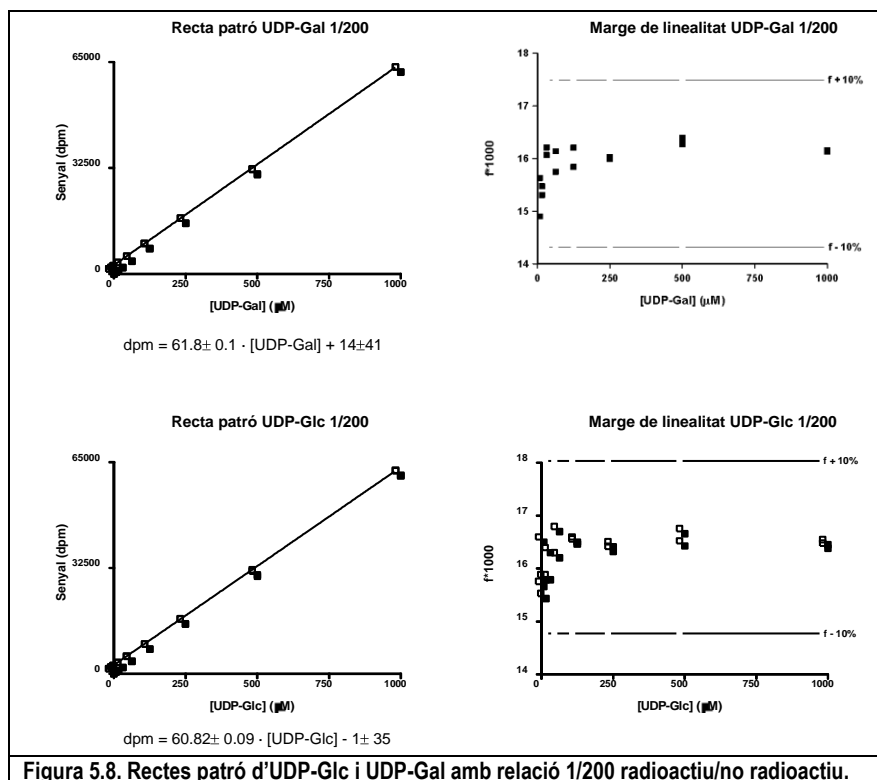
Les rectes patró dels donadors per a la ratio 1/50 s'han mesurat a diferents temps de comptatge en el comptador de centelleig per tal d'establir-ne el temps òptim segons el marge de linealitat del mètode proporcionat per cadascun. Aquest marge de linealitat es determina a partir d'un factor de resposta (f) que relaciona la concentració de donador amb el senyal obtingut. A partir de totes les concentracions analitzades es calcula un factor de resposta promig (f_{prom}) i es consideren dins del marge de linealitat aquelles concentracions que es troben dins l'interval $f_{\text{prom}} \pm 10\%$. S'han provat tres temps de comptatge diferents: 1 min, 2 min i 4 min. A la Taula 5.3 es presenten els resultats obtinguts. A partir d'ells es determina que el temps de comptatge òptim és 2 min. És amb aquest valor que s'obtenen les rectes patró per a la ratio 1/200.

Taula 5.3. Marge de linealitat per les rectes patró 1/50 a diferents temps de comptatge

Temps de comptatge	Marge de linealitat / μM	
	UDP-Glc 1/50	UDP-Gal 1/50
1 min	1.56 - 50	0.78 - 50
2 min	0.39 - 50	0.39 - 50
4 min	0.39 - 50	0.39 - 50

Idealment els patrons han d'obtenir-se mitjançant un procés el màxim de semblant possible al que s'emprarà posteriorment amb les mostres. En aquest cas les mostres se sotmeten a una extracció líquid/líquid i es mesura la radioactivitat de la fracció orgànica, la qual conté els productes de la reacció, mentre el substrat que no ha reaccionat es manté a la fase aquosa. Els patrons no poden tractar-se de la mateixa manera perquè no són solubles en el dissolvent orgànic. Per això en el procés d'obtenció de les rectes patró s'omet aquest pas i es comptabilitza la radioactivitat de les diferents concentracions de donador addicionant-lo sobre el líquid de centelleig, el qual prèviament s'ha mesclat amb el volum de dissolvent orgànic que contindran les mostres.

A la Figura 5.8 es presenten les rectes patró elaborades per als dos substrats donadors, UDP-Glc i UDP-Gal, i els corresponents marges de linealitat, en ambdós casos per a una relació radioactiu/no radioactiu igual a 1/200. Les mateixes dades però per a la relació 1/50 es presenten a la Figura 5.9. A les Taules 12.1 – 12.4 de l'Annex 1 es recullen les dades que corresponen a les rectes d'ambdues Figures i el procediment descrit per tal d'obtenir-les es resumeix en el punt 10.3.1 de la *Part Experimental*.



5.3.2 Optimització del procés d'extracció dels glicolípids sintetitzats

Tal com es pot veure a la Figura 5.7, el dissolvent orgànic escollit per dur a terme l'extracció dels glicolípids produïts per GT-MG517 és l'acetat d'etil (AcOEt). Aquesta tria es realitza en base a la bibliografia [Shimajima, M., *et al*,

1997]. Cal doncs comprovar que l'esmentat dissolvent és capaç d'extreure els glicolípid, ja que fins al moment, en els assajos qualitius visualitzats per TLC, l'extracció es realitzava amb una mescla de cloroform/MeOH 2:1.

Es preparen dues reaccions enzimàtiques segons el procediment descrit anteriorment en l'apartat 5.2 d'aquest capítol i es procedeix a l'extracció dels productes sintetitzats, en un cas amb la mescla cloroform/MeOH 2:1 i en l'altre amb AcOEt. La TLC corresponent posa de manifest que el nou dissolvent és capaç d'extreure els glicolípid de forma comparable a la mescla cloroform/MeOH 2:1.

Cal també determinar si l'AcOEt pot discriminar i extreure únicament els glicolípid de nova síntesi o si per contra, arrossega també una part del donador en excés que no ha reaccionat. En cas que això últim ocorri, cal establir el nombre de rentats amb NaCl 0.45 % necessaris per eliminar el donador de la fase orgànica abans de procedir al recompte de radioactivitat.

Es preparen dos còctels de reacció sense enzim, un UDP-Glc normal i l'altre amb UDP-Glc marcada (es fa igual per l'UDP-Gal). Per tots dos s'extreu una alíquota i s'addiciona a un tub Eppendorf que conté AcOEt. Es vortexa i s'addiciona NaCl 0.45 %. El conjunt se centrifuga i s'analitza la quantitat de radioactivitat present a la fase orgànica. El protocol seguit es descriu en el punt 10.3.2 de la *Part Experimental*. La mesura de la radioactivitat dona com a resultat el mateix valor per les mostres amb marca que per les mostres sense marcar. Per tant, un rentat amb NaCl 0.45 % és suficient per eliminar el possible donador que s'extregui amb l'AcOEt.

5.3.3 Preparació d'una reacció estàndard i obtenció de velocitats inicials

Un cop optimitzats tots els paràmetres relacionats amb el protocol experimental de l'assaig radiomètric i obtingudes les rectes patró de donadors, es procedeix a explicar com es prepara una reacció estàndard i com s'obtenen els corresponents valors de velocitat inicial que permeten després el càlcul de dades cinètiques relacionades amb GT-MG517.

Les condicions de reacció d'una preparació estàndard es descriuen a la Taula 5.4.

Taula 5.4. Condicions de reacció estàndard de l'assaig radiomètric

Compost	Concentració
HEPES pH 8	20 mM
MgCl ₂	20 mM
CHAPS	20 mM
DOG	1.25 mM
DOPG	12.5 mM
UDP- ¹⁴ C-Glc / UDP- ¹⁴ C-Gal	1 mM
GT-MG517 (en extracte o purificada)	Variable segons lot
T _{reacció}	35 °C

La preparació de les mostres consta de dos passos diferenciats, ja que primer s'obté una mescla que conté els compostos de naturalesa lipídica, el que s'anomena extracte lipídic i consta de miscel·les mixtes d'un detergent,

l'acceptor i altres lípids, i posteriorment s'addicionen a aquest extracte l'enzim, el qual també s'incorpora a les esmentades miscel·les, i el donador marcat.

5.3.3.1 Preparació de miscel·les mixtes detergent/acceptor/enzim.

La preparació de les miscel·les mixtes necessàries per a un adequat progrés de la reacció enzimàtica de GT-MG517 s'ha dut a terme en base a descripcions bibliogràfiques, ja que aquest mètode és l'aplicat en molts dels estudis cinètics de glicosiltransferases descrits en la "Introducció" d'aquest capítol [Maréchal, E. *et al*, 1994; Karlsson, O. *et al*, 1997]. El detergent escollit ha estat el CHAPS (àcid 3-[(colamidopropil)dimetilamoní]-1-propanesulfònic), si bé inicialment es va provar també amb SDS, ja que aquest és el detergent emprat en l'assaig qualitatiu de TLC per obtenir emulsions del substrat acceptor DOG. Les reaccions monitoritzades en un sistema de miscel·les mixtes de SDS no progressaven més enllà d'un 0.1 %. Probablement la concentració de detergent usada en la seva preparació no era suficient per a l'obtenció de miscel·les i només una part molt petita de la proteïna quedava en contacte amb els substrats, fent impossible que la reacció enzimàtica tingués lloc.

La preparació de les miscel·les mixtes de CHAPS, les quals també contenen altres lípids el paper dels quals es comentarà més endavant, el substrat acceptor DOG i l'enzim, es descriu àmpliament en el punt 10.3.3 de la *Part Experimental*. Aquí breument se'n comenta el procediment. Per una banda, els compostos de naturalesa lipídica s'introdueixen en un vial de vidre dissolts en cloroform i el dissolvent s'evapora sota un corrent de nitrogen. Per assegurar l'evaporació completa, es mantenen els vials durant 1 hora al buit. A continuació s'addiciona el CHAPS, juntament amb els altres components del tampó de reacció. Per tal que es formin les miscel·les, el conjunt es vortexa extensament i s'introdueix en un bany d'ultrasons durant 5 min. El resultat del procés és un medi transparent, fet que implica la correcta formació de les miscel·les. A la Taula 5.5 es presenta la composició estàndard dels extractes lipídics. Com es pot veure, les concentracions que consten a la Taula no són les finals en reacció, ja que l'extracte lipídic només representa un 54.5 % del volum total d'aquesta i els altres components, com el substrat donador o l'enzim, que s'hi addicionen posteriorment, en modifiquen la concentració.

Taula 5.5. Composició estàndard de l'extracte lipídic

Compost	Concentració
HEPES pH 8	36.7 mM
MgCl ₂	36.7 mM
CHAPS	36.7 mM
DOG	1.81 mM
DOPG	18.1 mM

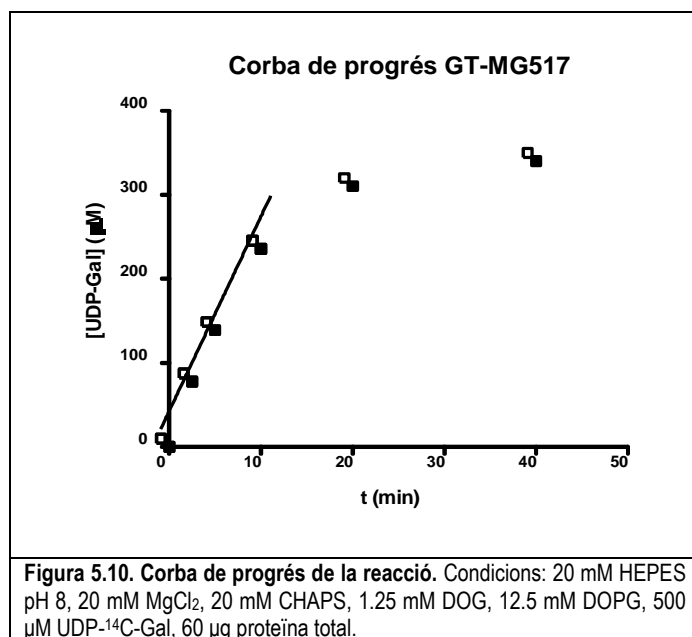
Un cop es disposa de l'extracte lipídic, s'hi addiciona l'enzim, ja sigui en forma d'extracte proteic o en forma de proteïna purificada. Per tal que aquest pugui incorporar-se a les miscel·les, es deixa un temps d'incubació a 4 °C no inferior a 30 min.

5.3.3.2 Obtenció d'una corba de progrés de reacció

Per tal d'obtenir paràmetres cinètics de la glicosiltransferasa en estudi, cal mesurar velocitats inicials de la reacció enzimàtica en diferents condicions. Aquestes poden calcular-se a partir de la zona lineal que es dona a l'inici de les corbes de progrés de les reaccions.

Una mescla de reacció (V_{total} de 110 μL) que conté l'extracte lipídic preparat tal com s'ha descrit en l'apartat anterior i en el qual ja s'ha incorporat la font enzimàtica es manté 10 min a 35 °C per tal de condicionar-la. El temps inicial de la corba de progrés el marca l'addició del donador marcat. A partir d'aquí, es treuen cinc alíquotes de 20 μL a diferents intervals de temps. Per tal de parar la reacció, cada alíquota s'addiciona sobre 500 μL d'AcOEt i es vortexa intensament. A continuació, s'addicionen 250 μL de NaCl 0.45 %, es vortexa novament i se centrifuga a 2500 rpm durant 5 min per tal d'obtenir una bona separació de les fases i, en conseqüència, una bona extracció dels glicolípids formats. Tot seguit, 350 μL de la fase orgànica s'addicionen sobre un vial de centelleig que conté 4 mL de líquid de centelleig i 0.5 mL de MeOH. La radioactivitat de cada mostra es compta en el comptador de centelleig durant 2 min (punt 10.3.4 de la *Part Experimental*).

A la Figura 5.10 es presenta una corba de progrés obtinguda a partir del mètode descrit, amb el corresponent ajust d'una recta a la zona lineal per tal de determinar la velocitat inicial de la reacció.



5.3.4 Repetibilitat de l'assaig radiomètric

La repetibilitat de l'assaig radiomètric dissenyat s'ha avaluat a partir del valor d'activitat específica obtingut per a tres rèpliques d'una mateixa reacció on la font enzimàtica era proteïna GT-MG517 purificada i les condicions de reacció les següents: 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG, 12.5 mM DOPG, 1 mM UDP-¹⁴C-Gal, 0.26 μM GT-MG517 activa.

Taula 5.6. Repetibilitat de l'assaig radiomètric

Activitat específica (U/mg prot)	
Rep. 1	1.38
Rep. 2	1.33
Rep. 3	1.12
Promig	1.28
Desv. Est	0.14
Coef. Var (%)	11

A la Taula 5.6 es presenten els resultats obtinguts, a partir dels quals es determina que el coeficient de variació de l'assaig és de l'11 %. Cal tenir en compte que aquest valor engloba tot el procés de preparació de mostres, a més del procés d'extracció d'alíquotes de la reacció i el tractament de mostra posterior. Per això es considera que un coeficient de variació de l'11 % és acceptable.

5.3.5 Determinació dels glicolípid formats en l'assaig radiomètric per HPLC-MS

Com s'ha comentat anteriorment, l'assaig radiomètric desenvolupat permet únicament la quantificació de la radioactivitat incorporada a la fase lipídica, fent impossible la distinció entre aquella part que s'incorpora en forma de MGlcDG i la que ho fa en forma de DGlcDG. Si l'objectiu de l'esmentat assaig és la seva aplicació a la determinació de paràmetres cinètics de GT-MG517, cal conèixer exactament quina o quines reaccions s'avaluen en tot moment, és a dir, si se segueix únicament la formació del primer terme de glicosilació o també s'hi inclou el segon.

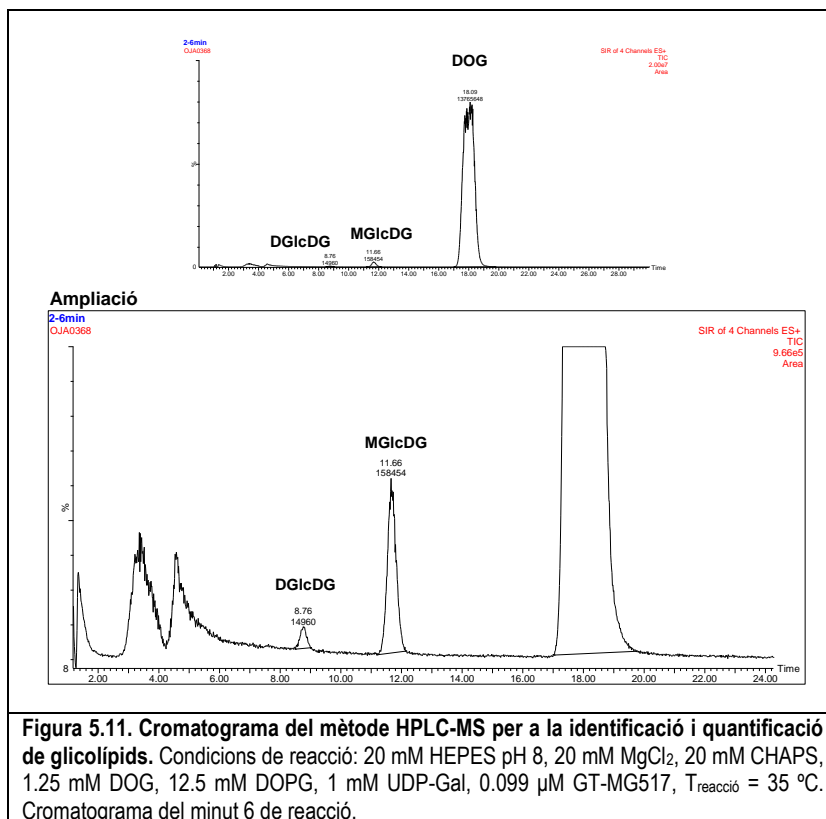
Per conèixer els productes que es formen al llarg de la reacció i, més important, per determinar quina reacció s'estudia cinèticament mitjançant l'assaig radiomètric, de forma paral·lela a la present tesi s'ha desenvolupat en el grup un mètode cromatogràfic d'HPLC (*high performance liquid chromatography*) per al seguiment de la reacció de GT-MG517 mitjançant la detecció i quantificació dels glicolípid formats amb un espectròmetre de masses [Mora, N.; Tesi doctoral, en curs]. A la Taula 5.7 es detallen les condicions cromatogràfiques i de detecció que s'utilitzen.

Taula 5.7. Condicions del mètode cromatogràfic d'HPLC-MS per a la detecció de glicolípid.

Característiques	
Cromatògraf	Acquity UPLC system (Waters)
Pre-columna	C18
Columna	Nova-Pack C18 (4 µm, 3.9 x 150 mm)
Fase mòbil	mescla 98:1 MeOH/aigua
Flux	1 ml/min
temps	30 min
Detector	Espectròmetre de masses ZMD (Waters): ESP+ / Mode SIR / Con 20 volts
m/z avaluades	[M+Na] ⁺ DOG = 644
	[M+Na] ⁺ MGlcDG = 806
	[M+Na] ⁺ DGlcDG = 968
	[M+Na] ⁺ TGlcDG = 1130

Com es pot veure, es tracta d'un mètode de separació en fase reversa en el qual s'utilitza l'espectròmetre de masses per a detectar únicament els ions dels compostos d'interès, que en aquest cas són el substrat acceptor de la reacció enzimàtica DOG i els seus tres primers productes de glicosilació: MGlcDG, DGlcDG i TGlcDG. En la Figura 5.11 es presenta un exemple d'un cromatograma en el qual es poden veure els pics del MGlcDG ($t_R = 11.7$ min) i del

DGlcDG ($t_R = 8.8$ min). També s'hi aprecia l'excés d'acceptor DOG que no reacciona i el qual representa el pic principal ($t_R = 18.1$ min).



Per a la quantificació dels glicolípids detectats en l'espectròmetre de masses s'utilitzen patrons de dos glicolípids comercials molt semblants al MGlcDG i al DGlcDG i que, per tant, s'espera que presentin un factor de resposta equivalent. Aquests són el MGDEG (monogalactosildiestearilglicerol) i el DGDEG (digalactosildiestearilglicerol).

Per a la caracterització cinètica de GT-MG517 mitjançant l'assaig radiomètric s'obtenen corbes de progrés seguint el procediment explicat anteriorment. El càlcul de velocitats inicials es fa a partir de l'ajust d'una recta a la part inicial de les esmentades corbes de progrés (veure Figura 5.10), moment en el qual encara no s'ha assolit el 10% de conversió del substrat donador. En funció de la identitat d'aquest, el seguiment de la reacció té lloc durant 10 minuts, si es tracta d'UDP-Gal, o durant 20 min, si és UDP-Glc. Per tant, l'objectiu de l'aplicació del mètode de separació i identificació de glicolípids és la determinació dels productes que es formen en la reacció de GT-MG517 durant aquests dos períodes de temps.

Per fer-ho, es preparen dues reaccions equivalents a les emprades en un assaig radiomètric, però amb donador no marcat i es procedeix de la mateixa forma, tot extraient al·lòtques de 20 μ L a diferents temps al llarg d'una hora. Per a cada al·lòtqua, s'atura la reacció a partir de la seva addició sobre 200 μ L de MeOH, i la mescla resultant s'injecta directament al cromatògraf, tal com s'explica en el punt 10.5 de la *Part Experimental*.

A la Figura 5.12 es presenten els resultats obtinguts. Pot observar-se com quan el donador de la reacció catalitzada per GT-MG517 és UDP-Glc, durant la primera hora de reacció aquesta només produeix el primer terme de

glicosilació, és a dir MGlcDG, i que el DGlcDG no és detectable amb el mètode utilitzat. Per tant, i ja que l'assaig radiomètric en aquest cas segueix la reacció un màxim de 20 minuts, es pot afirmar que únicament monitoritza la primera part de la reacció enzimàtica en la qual es transfereix la unitat de glucosa a l'acceptor DOG. Així doncs, tots els paràmetres cinètics que es determinin amb l'esmentat assaig radiomètric són associables a GT-MG517 actuant com a MGlcDG sintasa.

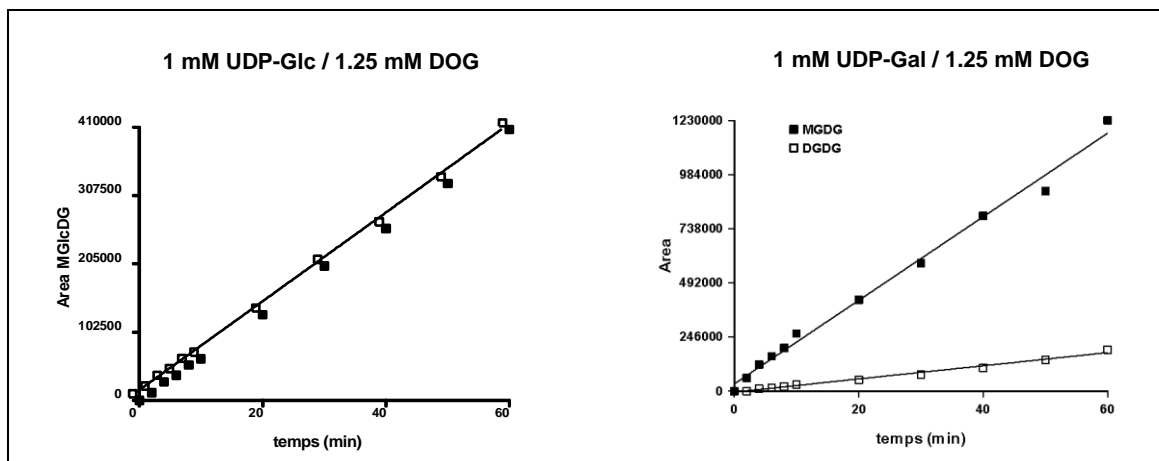


Figura 5.12a. Productes sintetitzats per GT-MG517 durant 1 hora de reacció analitzats per HPLC-MS. Condicion de reacció: 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG, 12.5 mM DOPG, 1 mM donador, 0.099 µM GT-MG517, T_{reacció} = 35 °C. Dades a la Taula 12.5 de l'Annex 1.

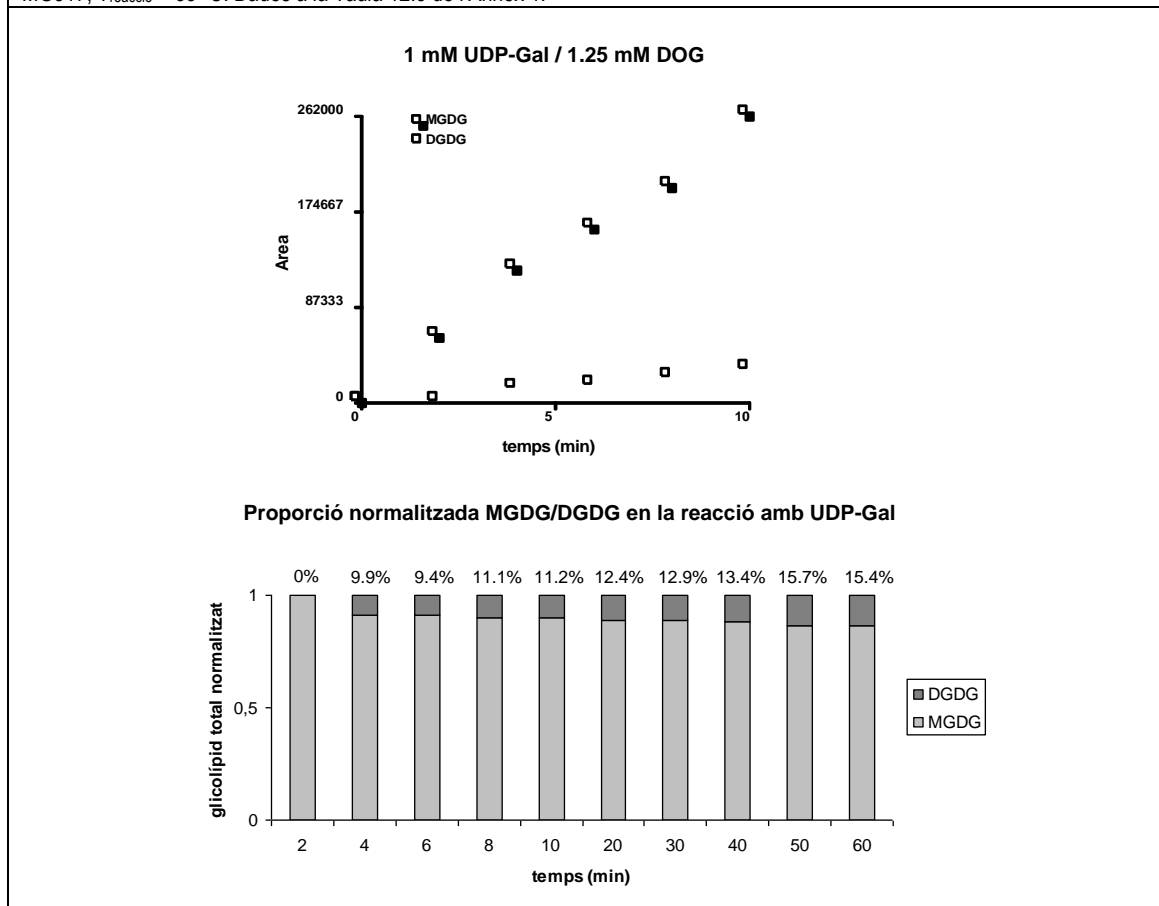


Figura 5.12b. Anàlisi per HPLC-MS de la presència de DGDG en el total de lípids sintetitzats per GT-MG517 durant 1 hora de reacció. Condicion de reacció: 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG, 12.5 mM DOPG, 1 mM UDP-Gal, 0.099 µM GT-MG517, T_{reacció} = 35 °C.

Quan el donador és UDP-Gal, la situació és lleugerament diferent, ja que s'observa l'aparició del segon terme de glicosilació a partir del minut 4 de reacció. Ara bé, si es considera la quantitat de DGDG present en relació a la quantitat de MGDG (valor que apareix en percentatge sobre les columnes del segon gràfic en la Figura 5.12b), es determina que al llarg dels 10 minuts en els quals té lloc el seguiment de la reacció de GT-MG517 mitjançant l'assaig radiomètric, l'esmentada proporció pràcticament no supera el 10%. Així doncs, pot considerar-se que els paràmetres cinètics que s'obtenen són associables directament a l'enzim que es troba actuant com a MGDG sintasa, igual com ocorre quan el donador és UDP-Glc.

L'anàlisi dels productes formats en la reacció catalitzada per GT-MG517 s'ha realitzat emprant proteïna purificada. Ara bé, les conclusions extreïtes s'apliquen també als assajos realitzats sobre extractes proteics i que es detallen a continuació.

5.4 Caracterització cinètica de GT-MG517 en extracte proteic

Tal com s'ha explicat en el Capítol 4 "*Expressió i purificació de GT-MG517*", s'ha desenvolupat un sistema d'expressió de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* en *E.coli* el qual permet l'obtenció de l'enzim soluble i funcional mitjançant la seva coexpressió amb xaperones i l'extracció amb un tampó que conté un detergent. En aquest punt del treball es detalla la caracterització cinètica de GT-MG517 quan es troba en l'extracte proteic generat en l'esmentada extracció.

5.4.1 Obtenció de l'extracte proteic

L'extracte proteic que conté GT-MG517 s'obté a partir d'un cultiu de cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 Star cotransformades amb els plasmidis pET517HisC i pGro7. El creixement del cultiu i la inducció de l'expressió proteica es realitza segons el protocol descrit en el punt 9.1.2 de la *Part Experimental*.

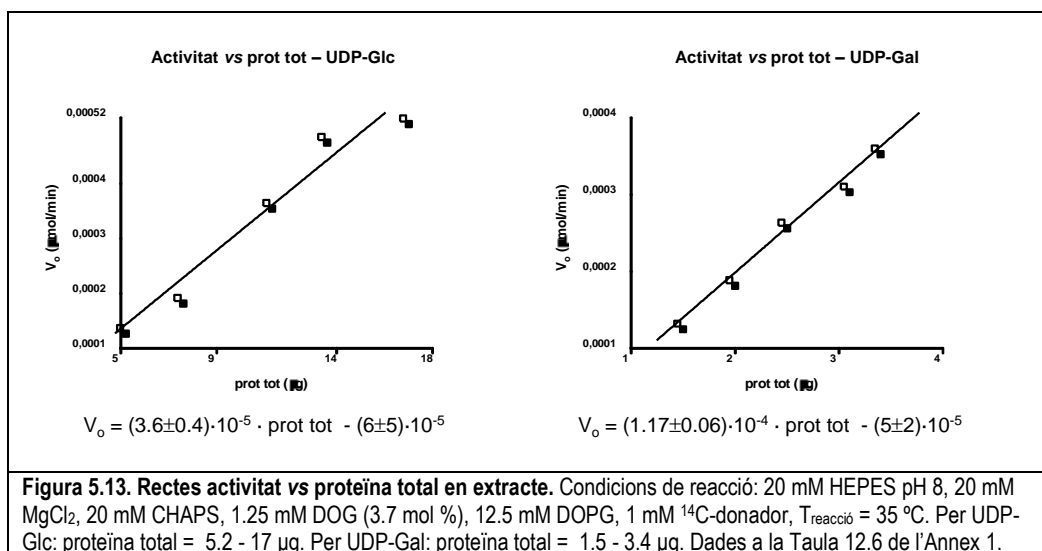
Per tal d'assegurar que el procés d'extracció solubilitza la major quantitat possible de la glicosiltransferasa d'interès, s'escull un tampó que combina glicerol, un detergent i una elevada força iònica. La seva composició és 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 22 mM CHAPS i 10% glicerol. L'extracció es descriu en el mateix punt 9.1.2 de la *Part Experimental* i la concentració de proteïna total obtinguda en l'extracte final es quantifica mitjançant el mètode de BCA descrit en el punt 9.6.2 de la *Part Experimental*.

5.4.2 Activitat específica de GT-MG517 en extracte

L'activitat específica de GT-MG517 en extracte s'ha determinat mitjançant l'assaig radiomètric i per a dos substrats donadors, UDP-Glc i UDP-Gal.

Inicialment i per tal de comprovar que l'activitat mesurada en l'esmentat assaig radiomètric és una activitat enzimàtica, es realitza una recta d'activitat vs quantitat de proteïna total, preparant diferents dilucions de l'extracte proteic amb el tampó d'extracció. Com a control negatiu es treballa amb un extracte proteic equivalent però provinent d'un cultiu de cèl·lules d'*E. Coli* que no expressen GT-MG517. Es comprova que l'activitat presentada per aquest control es troba als mateixos nivells que els blancs de reacció.

A la Figura 5.13 es presenten les rectes activitat vs proteïna total pels dos substrats donadors provats. Queda clar que l'activitat mesurada és adjudicable a la presència de GT-MG517 en l'extracte proteic, ja que s'observa l'esperada relació lineal entre activitat i proteïna total present en reacció.



Cal fer esment que l'ordenada a l'origen de les rectes d'activitat vs proteïna total, la qual hauria d'aproximar-se a zero ja que en absència de proteïna no pot haver-hi activitat, té un valor força diferent i negatiu en ambdós casos. Això podria estar indicant que el mètode de quantificació de proteïna total que s'utilitza, el mètode de BCA, està subestimant els valors que proporciona. Cal tenir en compte que per obtenir la recta patró a partir de la qual es calculen els valors de proteïna total presents als extractes, es treballa amb BSA (albúmina de sèrum boví) i les diferents dilucions es preparen amb tampó d'extracció. Ara bé, quan es quantifiquen els extractes, aquests contenen a més de les proteïnes i l'esmentat tampó d'extracció, altres components solubilitzats també per aquest. Podria ocórrer que algun d'aquests compostos interferís en l'assaig i en modifiqués els resultats. D'altra banda, s'ha considerat que el mètode de BCA és l'únic assaig de quantificació de proteïnes aplicable al sistema amb el qual es treballa, ja que és compatible amb la presència de detergents i concentracions elevades de glicerol.

Taula 5.8. Activitat específica de GT-MG517 en extracte a partir de les rectes activitat vs proteïna total.

	Activitat específica	
	UDP-Glc	UDP-Gal
µmol/min·µg prot tot	$(3.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-5}$	$(1.17 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}$
U/mg prot tot	0.036±0.004	0.117±0.006

Del pendent de les rectes de la Figura 5.13, pot obtenir-se un valor d'activitat específica (Taula 5.8) per GT-MG517 en extracte per a UDP-Glc i UDP-Gal.

Si bé el procediment d'obtenció de l'extracte proteic s'ha mantingut constant en tots els experiments realitzats, existeixen molts paràmetres que poden influir sobre l'expressió de GT-MG517, com ara l'estat de les cèl·lules del cultiu, el punt en el qual s'ha finalitzat el mateix, petites diferències en el procés de lisi per sonicació, etc. Per aquest motiu, és esperable una certa variabilitat en la quantitat de glicosiltransferasa present en cadascun dels extractes amb els quals s'ha treballat, fet que fa necessari presentar l'activitat específica de l'enzim en extracte no com un únic valor, sinó com un interval. A la Taula 5.9 es presenten els valors d'activitat específica determinats per a diferents lots d'extracte, tant per UDP-Glc com per UDP-Gal.

Taula 5.9. Activitat específica de GT-MG517 en extracte.

Lot extracte	Activitat específica (U/mg prot tot)	
	UDP-Glc	UDP-Gal
Recta activitat vs prot tot	0.036	0.117
Michaelis-Menten	0.052 *	0.262
Tampons d'extracció	-	0.236

* Valor promig entre els dos punts realitzats en les mateixes condicions per a la M-M (0.054 i 0.050).

S'observa que l'activitat específica de GT-MG517 en extracte quan el substrat donador és UDP-Gal varia entre 0.117 – 0.262 U/mg de proteïna total, mentre que quan el substrat donador és UDP-Glc la variació és quelcom menor i es troba entre 0.036 – 0.052 U/mg de proteïna total. Així doncs, si es compara l'activitat específica de l'enzim amb ambdós substrats, es determina que aquesta és entre 3.25 i 5 vegades superior amb UDP-Gal que amb UDP-Glc.

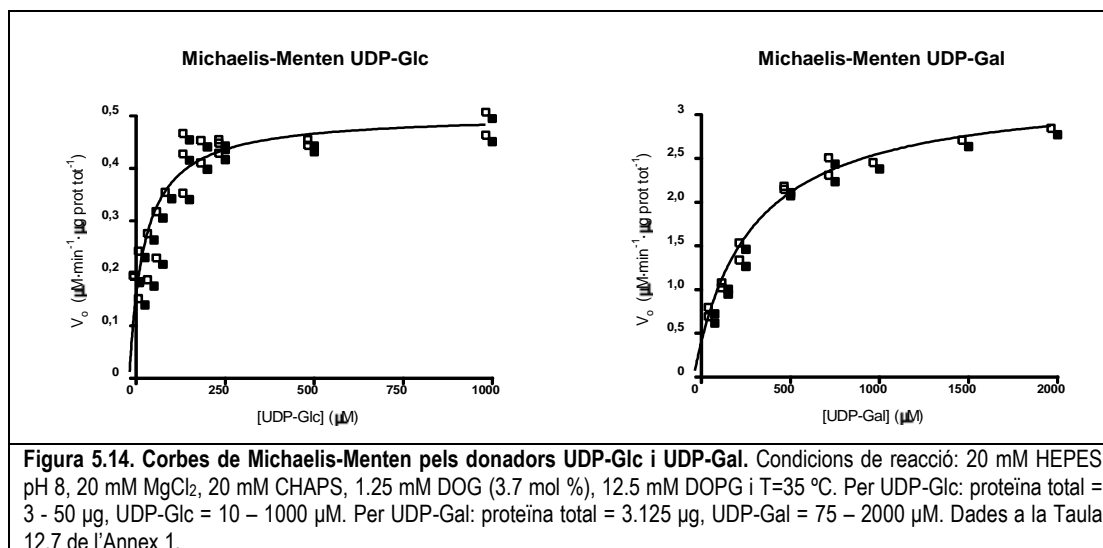
Aquesta tendència és oposada a la que s'observa per a la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae*, MPN483, per la qual, l'activitat específica *in vitro* quan es troba en extracte és lleugerament superior amb UDP-Glc, en concret un factor de 1.25 vegades si es compara amb UDP-Gal, sempre que el substrat acceptor sigui DAG [Rosén Klement, M., *et al*, 2007].

5.4.3 Paràmetres cinètics aparents del substrat donador per GT-MG517 en extracte

L'obtenció dels paràmetres cinètics del substrat donador, tant UDP-Glc com UDP-Gal, per la glicosiltransferasa en estudi s'ha realitzat a partir de l'assaig radiomètric. S'han utilitzat les condicions de reacció estàndard (veure Taula 5.4), variant les concentracions de donador des de 0 - 1 mM en el cas de l'UDP-Glc i des de 0 – 2 mM en el cas de l'UDP-Gal. En les reaccions en les quals la concentració de donador era inferior o igual a 50 µM, s'ha canviat la relació radioactiu/no radioactiu de la dissolució stock de l'habitual 1/200 a la més concentrada 1/50. En cada cas s'ha realitzat un blanc de reacció a 1 mM de donador però sense extracte proteic. Durant el temps de la cinètica no s'ha detectat cap senyal distingible del blanc.

Pel que fa a l'extracte proteic emprat, per a cada corba de Michaelis-Menten s'ha utilitzat un lot diferent pel qual s'ha obtingut la seva activitat específica com a control (veure Taula 5.9).

A la Figura 5.14 es presenten les corbes de Michaelis-Menten pels dos substrats donadors. Els paràmetres cinètics derivats de l'ajust es recullen a la Taula 5.10.



Taula 5.10. Paràmetres cinètics aparents dels donadors UDP-Glc i UDP-Gal per a GT-MG517 en extracte.

Donador	K_M^{app} (μM)	$V_{m\grave{a}x}^{app}$ (μM·min ⁻¹ ·μg prot tot ⁻¹)	$(V_{m\grave{a}x}/K_M)^{app}$ (min ⁻¹ ·μg prot tot ⁻¹)
UDP-Glc	43 ± 9	0.49 ± 0.03	0.010 ± 0.003
UDP-Gal	316 ± 28	3.2 ± 0.1	0.010 ± 0.001

Existeixen diferències notables en els paràmetres cinètics dels donadors testats. L'afinitat de l'enzim és superior per UDP-Glc, en concret 7 vegades més que per UDP-Gal, tal com es comprova amb els valors de K_M per ambdós substrats. En canvi, l'enzim pot sintetitzar glicolípid molt més ràpid (6.5 vegades més) si el substrat és UDP-Gal que no si es tracta d'UDP-Glc. No obstant, si es calcula l'eficiència catalítica de l'enzim (cal tenir en compte que com que es treballa amb extracte proteic i no amb proteïna purificada no és possible calcular el paràmetre k_{cat}/K_M) en forma de $V_{m\grave{a}x}/K_M$, s'obté el mateix valor per ambdós substrats donadors. Això vol dir que quan l'enzim es troba en un extracte proteic pot emprar de forma indistinta els substrats donadors UDP-Glc i UDP-Gal.

5.5 Caracterització cinètica de GT-MG517 purificada

En el Capítol 4 "Expressió i purificació de GT-MG517" de la present tesi s'han discutit àmpliament els diferents processos de purificació estudiats per a l'obtenció de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* amb un nivell de puresa acceptable per a la realització d'assajos cinètics. En aquest punt es descriu la caracterització cinètica de l'enzim purificat segons aquell protocol que s'ha considerat més adequat per complir uns criteris de puresa i concentració de la proteïna suficients, tot i que no n'aconsegueix la purificació fins a homogeneïtat.

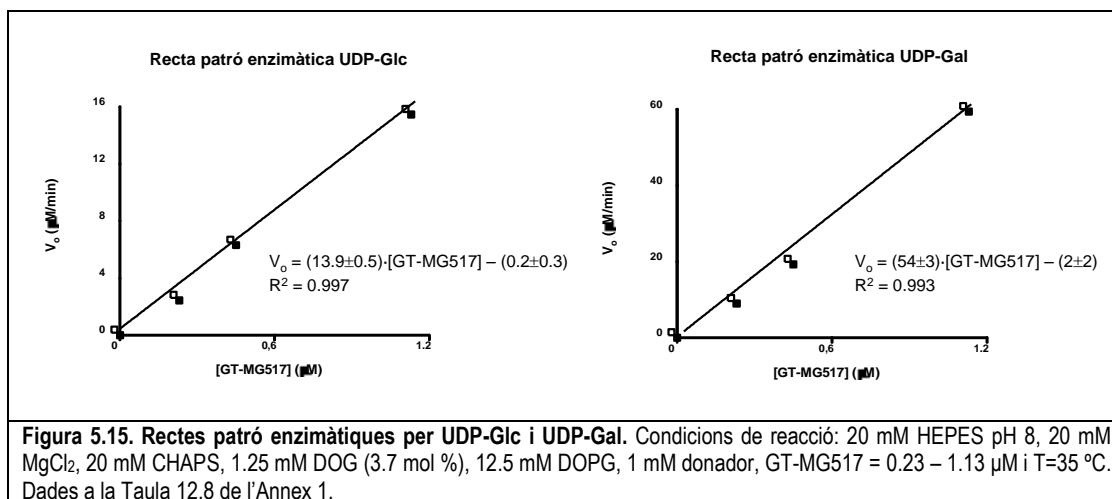
5.5.1 Obtenció de GT-MG517 purificada

L'enzim s'aïlla a partir d'un litre de cultiu de cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 Star cotransformades amb els plasmidis pET517HisC i pGro7. El creixement, la inducció proteica i l'extracció de la proteïna amb el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20% glicerol es realitzen segons el protocol 9.1.3 de la *Part Experimental*.

L'extracte resultant es carrega a una columna d'afinitat, on GT-MG517 s'uneix gràcies a la cua d'His que se li ha col·locat a l'extrem C-terminal de la seqüència d'aminoàcids. A continuació s'elimina el detergent CHAPS que es troba unit a la proteïna mitjançant el pas d'un tampó la composició del qual és 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20% glicerol. Ja amb aquest nou tampó lliure de detergent, es procedeix a l'elució de la proteïna mitjançant un graó de 300 mM d'imidazole (punt 9.2, Taula 9.3 de la *Part Experimental*). La proteïna purificada d'aquesta forma es dialitza i es quantifica per BCA utilitzant BSA com a proteïna patró (punt 9.6.2 de la *Part Experimental*).

5.5.2 Rectes patró enzimàtiques

S'han construït dues rectes patró enzimàtiques, una pel substrat donador UDP-Glc i l'altra pel substrat donador UDP-Gal, a partir de l'enzim purificat segons s'ha explicat en el punt anterior. Per fer-ho, s'han mesurat les velocitats inicials de reaccions amb diferents concentracions de proteïna determinades mitjançant el mètode de BCA (Figura 5.15).



El pendent de la relació lineal obtinguda s'ha establert com a activitat específica de referència ($a_{\text{esp ref}}$) i s'ha utilitzat per calcular la concentració d'enzim actiu en els experiments que es descriuen a continuació en aquest capítol (Taula 5.11).

Taula 5.11. Activitat específica de GT-MG517 purificada.

	Activitat específica	
	UDP-Glc	UDP-Gal
μM/min·μM GT-MG517	13.9±0.5	54±3
U/mg GT-MG517	0.33±0.01	1.28±0.07

Si es comparen els valors d'activitat específica de GT-MG517 en extracte (Taula 5.9) i un cop purificada per cromatografia d'afinitat, s'observa que l'enriquiment del procés de purificació no és molt important. Per al substrat donador UDP-Glc, l'augment en l'activitat específica es troba en un factor d'entre 6 i 9 vegades, mentre que pel substrat UDP-Gal aquest factor és del mateix ordre, tot i que quelcom superior (entre 5 i 11 vegades). Si es comparen ambdós valors entre ells, s'aprecia que amb UDP-Gal l'activitat específica és 4 vegades més gran que

amb UDP-Glc. Aquesta relació concorda amb la relació d'activitats específiques amb els dos substrats que tenia GT-MG517 en extracte i que era d'entre 3.5 i 5 en funció del lot.

5.5.3 Paràmetres cinètics de GT-MG517 com a monoglicosildiacilglicerol sintasa

En aquest apartat s'inclou l'estudi i anàlisi de l'activitat de GT-MG517 quan actua com a monoglicosildiacilglicerol sintasa, és a dir, quan únicament incorpora una unitat sacarídica al seu substrat acceptor DOG (Figura 5.16).

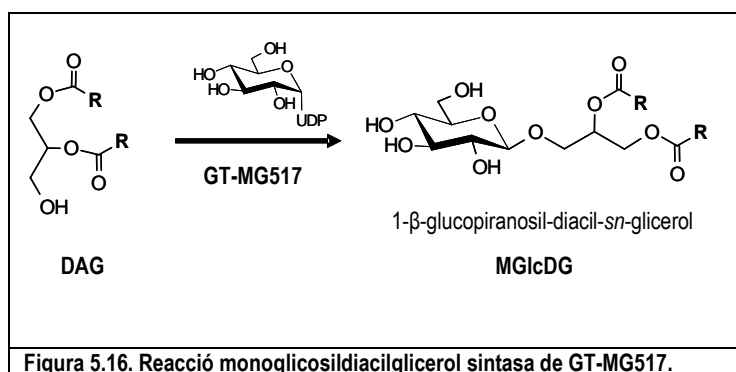


Figura 5.16. Reacció monoglicosildiacilglicerol sintasa de GT-MG517.

Aquest comportament no és degut a una parada de la reacció, sinó a un seguiment de la reacció que inclou només el període de temps en el qual té lloc l'esmentada incorporació d'una glucosa o una galactosa, tal com s'ha demostrat mitjançant el mètode d'HPLC-MS descrit en el punt 5.3.5 del present capítol.

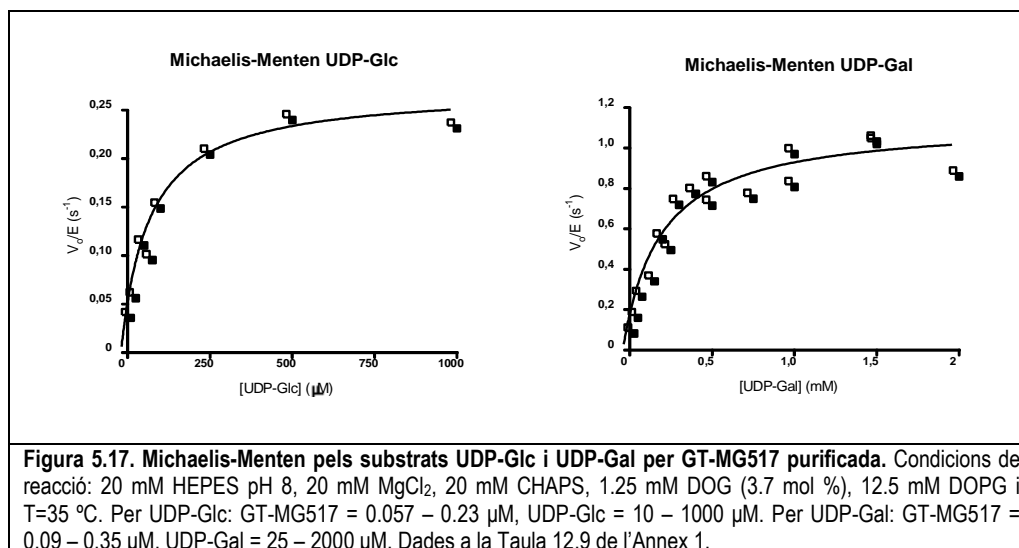
5.5.3.1 Paràmetres cinètics aparents del substrat donador

Els paràmetres cinètics aparents del substrat donador, tant per UDP-Glc com per UDP-Gal, s'han determinat mitjançant l'aplicació de l'assaig radiomètric en les condicions estàndards de 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl_2 , 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG (3.7 mol %), 12.5 mM DOPG i $T = 35^\circ\text{C}$. Les concentracions dels donadors s'han variat des de 0 – 1 mM en el cas de l'UDP-Glc i des de 0 – 2 mM en el de l'UDP-Gal. Igual que per determinar els paràmetres de GT-MG517 en extracte, quan la concentració de donador és igual o inferior a 50 μM , s'utilitza la relació radioactiu/no radioactiu de 1/50. Com a control negatiu s'ha treballat amb reaccions en les quals no hi havia enzim i s'ha comprovat que al llarg de la corba de progrés no s'obtenia cap valor diferent al blanc.

Els paràmetres cinètics per GT-MG517 purificada es calculen a partir de les corbes presentades a la Figura 5.17 i es presenten a la Taula 5.12.

Taula 5.12. Paràmetres cinètics aparents dels donadors UDP-Glc i UDP-Gal per a GT-MG517 purificada.

Donador	K_M^{app} (μM)	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (s^{-1})	$(k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{app}}$ ($\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)
UDP-Glc	87 ± 16	0.27 ± 0.02	0.0031 ± 0.0008
UDP-Gal	234 ± 45	1.10 ± 0.06	0.005 ± 0.001

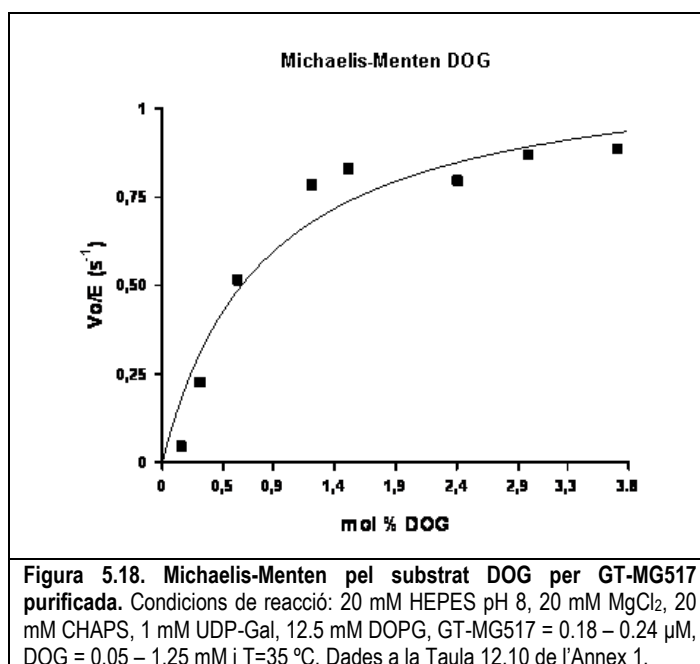


Pel que fa a l'afinitat de l'enzim pel substrat, representada per K_M , la proteïna presenta una major afinitat per UDP-Glc que per UDP-Gal, exactament igual com passava quan aquesta es trobava en extracte. No obstant això, la diferència d'afinitats no és tan acusada, ja que per l'enzim aïllat la K_M d'UDP-Gal és 2.7 vegades més gran que la K_M d'UDP-Glc (i per l'enzim en extracte aquesta diferència era de 7 vegades). Pel que fa a la velocitat catalítica, representada per k_{cat} , la glicosiltransferasa sintetitza glicolípid més ràpid quan el substrat donador és UDP-Gal, en concret 4 vegades més ràpid que si el substrat donador és UDP-Glc. De nou es repeteix la mateixa tendència que quan l'enzim es troba en extracte, tot i que també la relació entre els paràmetres d'ambdós substrats disminueix, ja que en extracte amb UDP-Gal era 6.5 vegades més ràpid que amb UDP-Glc. L'anàlisi de l'eficiència catalítica de GT-MG517 en termes de k_{cat}/K_M revela que l'enzim no presenta preferències per un substrat donador o altre, ja que si es té en compte l'error dels valors calculats, aquests poden considerar-se pràcticament iguals entre ells. Aquesta característica també s'ha observat quan la proteïna es troba en extracte.

5.5.3.2 Paràmetres cinètics aparents del substrat acceptor

S'han determinat els paràmetres cinètics aparents pel substrat acceptor DOG mitjançant l'aplicació de l'assaig radiomètric amb les condicions de 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 12.5 mM DOPG, 1 mM UDP-¹⁴C-Gal, $T_{reacció} = 35$ °C. Les concentracions d'acceptor s'han variat des de 0.05 – 1.25 mM DOG. Cal dir que la variació de la concentració d'un dels components de l'extracte lipídica implica modificacions en les miscel·les mixtes que el constitueixen. Per tal de no provocar canvis en el sistema que es puguin reflectir en canvis d'activitat no associables a la pròpia variació de la concentració d'acceptor, es treballa dins d'un marge molt estret de concentracions, el qual genera una modificació de la quantitat de molècules amfífilques molt petit. Així, la quantitat total d'aquestes molècules s'ha mantingut gairebé constant a 32.5 mM (20 mM CHAPS + 12.5 mM DOPG), amb un màxim de 33.75 mM i un mínim de 32.55 mM. Quan la quantitat d'acceptor es varia en sistemes de miscel·les mixtes és habitual expressar la seva quantitat en percentatge molar, essent la quantitat total de molècules amfífilques la referència, ja que són les que formen les miscel·les del sistema.

Les dades cinètiques per a la variació de la concentració de DOG a una concentració constant de donador s'ajusten a una equació de Michaelis-Menten, tal com es pot veure a la Figura 5.18. Els corresponents paràmetres que es deriven de l'ajust de l'equació es detallen a la Taula 5.13.



Taula 5.13. Paràmetres cinètics aparents de l'acceptor DOG per a GT-MG517 purificada.

K_M^{app} (mol % DOG)	k_{cat}^{app} (s ⁻¹)	$(k_{cat}/K_M)^{app}$ (s ⁻¹ ·mol % ⁻¹)
0.8 ± 0.3	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.6

Per tal de poder comparar l'afinitat de l'enzim pel substrat acceptor, representada per la K_M , amb l'afinitat pel donador cal convertir el valor obtingut a unes unitats de concentració que ho permetin. Així l'equivalència de la K_M obtinguda és de $266 \pm 92 \mu\text{M}$, un valor del mateix ordre que la que la glicosiltransferasa té pel substrat donador UDP-Gal (veure Taula 5.12); en canvi, és 3 vegades menor que la que presenta per l'altre substrat donador, UDP-Glc.

A partir de la corba de Michaelis-Menten per al DOG, s'estableix que en les mateixes corbes però per als substrats donadors UDP-Gal i UDP-Glc la concentració de DOG utilitzada, 1.25 mM o 3.7 mol %, està saturant l'enzim. Així doncs, els paràmetres cinètics determinats per als esmentats donadors són valors reals.

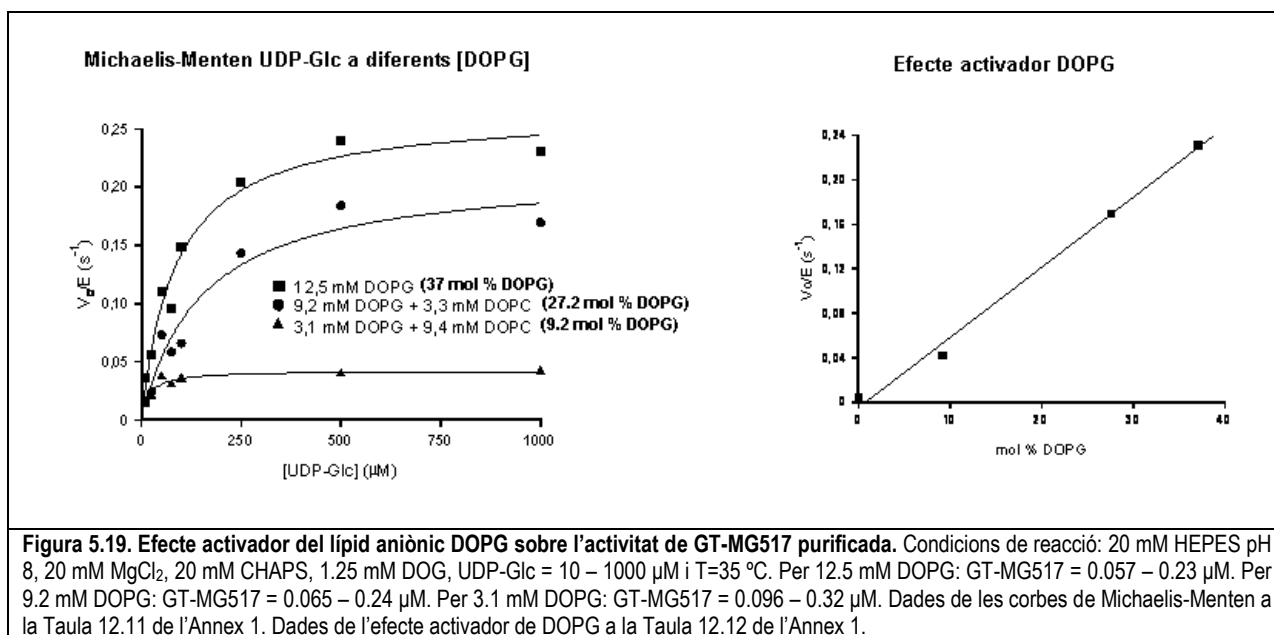
5.5.3.3 Influència dels lípids aniònics sobre l'activitat de GT-MG517

Tal com s'ha comentat en la "Introducció" d'aquest capítol, l'activitat d'algunes de les glicosiltransferases que sintetitzen glicolípids es veu incrementada per la presència de lípids aniònics i especialment per DOPG (dioleilfosfatidilglicerol). En alguns casos, aquesta dependència és tan gran que l'enzim aïllat, és a dir, extret del seu entorn lipídic, no és actiu si no es complementa amb l'esmentat lípid. Aquest fet és cert tant per la MGlcDG sintasa com per la DGlcDG sintasa d'*Acholeplasma laidlawii* [Karlsson, O. *et al*, 1997; Vikström, S. *et al*, 1999].

Pel que fa a GT-MG517, s'ha comprovat que l'enzim purificat segons s'ha descrit en el punt 5.5.1 presenta una activitat residual si DOPG no forma part de l'extracte lipídic (0.0046 s^{-1} en les condicions de 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl_2 , 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG (3.7 mol %), 1 mM UDP- ^{14}C -Glc, GT-MG517 = $0.24 \text{ } \mu\text{M}$ i $T=35 \text{ } ^\circ\text{C}$). Davant d'aquest fet, s'ha optat per incorporar sempre l'esmentat compost a les mescles de reacció per tal de determinar els paràmetres cinètics de l'enzim. Cal dir, però, que prèviament s'ha demostrat mitjançant l'anàlisi qualitatiu per TLC que l'enzim no pot utilitzar l'esmentat lípid com a acceptor, tot i tenir un hidroxil lliure.

Per tal d'establir la dependència existent entre l'activitat enzimàtica de GT-MG517 i la concentració de DOPG present en el medi s'ha realitzat l'estudi que es detalla a continuació. S'han calculat els paràmetres cinètics de l'enzim mantenint la concentració de substrat acceptor DOG constant i variant la concentració de substrat donador UDP-Glc a diferents concentracions de DOPG. Cal remarcar que per tal de no modificar la concentració de molècules amfifíliques presents en els extractes lipídics, les variacions en la concentració de DOPG s'han compensat mitjançant la substitució del lípid aniónic per un lípid neutre, DOPC (dioleilfosfatidilcolina), el qual s'ha descrit que no afecta l'activitat enzimàtica de les glicosiltransferases, tant d'*Acholeplasma laidlawii* com de *Mycoplasma pneumoniae* [Karlsson, O. *et al*, 1997; Vikström, S. *et al*, 1999; Rosén Klement, M. *et al*, 2007]. La necessitat de mantenir una concentració de molècules amfifíliques constant a mesura que es varia la concentració de DOPG ve donada per la necessitat d'assegurar que els canvis que puguin observar-se en l'activitat de l'enzim només es troben relacionats amb la modificació de la concentració de DOPG i no amb variacions en les miscel·les que contenen la proteïna i els seus substrats.

Les condicions de reacció emprades han estat les estàndards de 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl_2 , 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG (3.7 mol %), $T_{\text{reacció}} = 35 \text{ } ^\circ\text{C}$. El substrat donador UDP- ^{14}C -Glc s'ha variat des de 0 – 1 mM i el lípid activador DOPG, des de 0 – 12.5 mM, sempre mantenint una concentració constant de molècules amfifíliques a 33.75 mM (aquesta concentració inclou el CHAPS 20 mM, el DOG 1.25 mM, el DOPG i el DOPC).



Les dades cinètiques obtingudes per a la variació de la concentració de donador a una concentració constant d'acceptor i per diferents concentracions de DOPG s'ajusten en tots els casos a una equació de Michaelis-Menten, com es pot veure en el primer gràfic de la Figura 5.19. Els paràmetres cinètics aparents de cada corba es resumeixen a la Taula 5.14.

Taula 5.14. Paràmetres cinètics aparents del donador UDP-Glc a diferents concentracions de DOPG.

[DOPG] (mM)	K_M^{app} (μ M)	k_{cat}^{app} (s^{-1})	$(K_{cat}/K_M)^{app}$ ($s^{-1} \cdot \mu M^{-1}$)
12.5	87 ± 16	0.27 ± 0.02	0.0031 ± 0.0008
9.2	153 ± 44	0.21 ± 0.02	0.0014 ± 0.0005
3.1	19 ± 5	0.042 ± 0.003	0.0022 ± 0.0007

S'observa com tant l'afinitat de l'enzim pel substrat, representada per K_M , com la velocitat de la reacció, representada per k_{cat} , presenten dependència respecte la concentració de DOPG en reacció. Mentre que no existeix una tendència clara per descriure el comportament de K_M a diferents quantitats d'activador, el valor de k_{cat} disminueix a mesura que disminueix la concentració de DOPG.

La relació existent entre K_M , és a dir l'afinitat de l'enzim pel substrat, i la concentració de DOPG s'ha estudiat en el cas de la MGlcDG sintasa d'*Acholeplasma laidlawii* [Karlsson, O. *et al*, 1997]. Per aquest enzim, DOPG no modifica la interacció entre el substrat donador UDP-Glc i l'enzim; mentre que sí que augmenta la velocitat de la catàlisi enzimàtica de forma cooperativa. En el cas de GT-MG517 sembla poc probable que el lípid aniònic DOPG sigui capaç de modificar la unió del substrat. Els diferents valors de K_M són atribuïbles a l'error en l'ajust de la corba de Michaelis-Menten, especialment per a la concentració més baixa de DOPG.

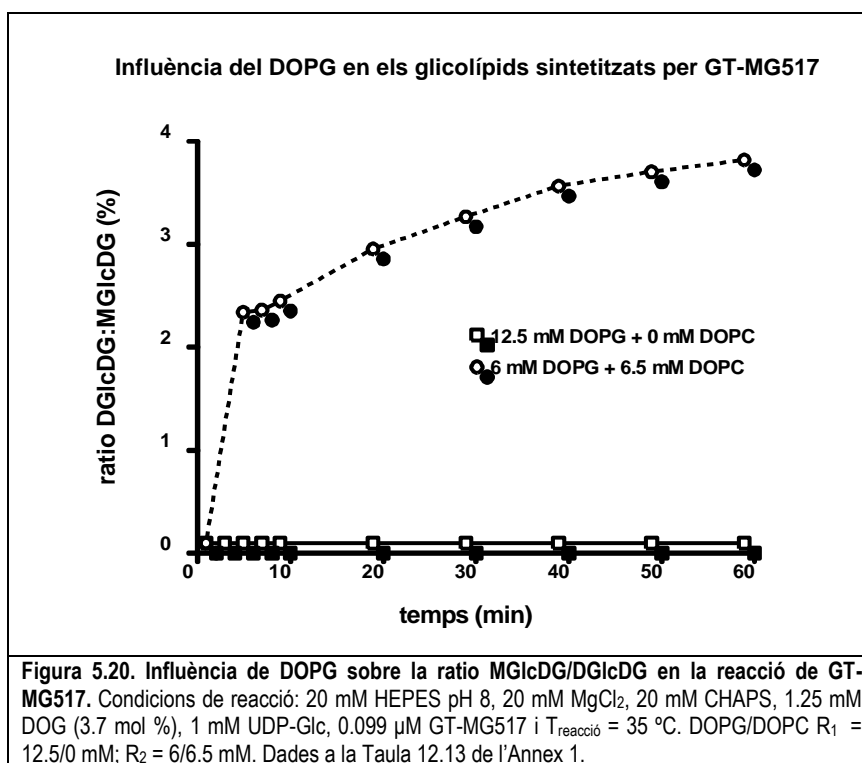
En el segon gràfic de la Figura 5.19 es presenta la correlació de les velocitats inicials de reacció en unes condicions estàndards de 1 mM UDP- ^{14}C -Glc i 1.25 mM DOG (3.7 mol %) per diferents concentracions de DOPG. L'ajust lineal de les dades confirma el paper d'activador de la reacció enzimàtica de l'esmentat lípid aniònic, ja que a més quantitat de DOPG, més ràpida és la reacció.

El mateix efecte activador per part del DOPG es descriu per la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae* [Rosén Klement, M. *et al*, 2007]. A més, la presència del lípid aniònic genera un canvi en la relació de concentracions dels diferents termes de glicosilació del DAG que sintetitza l'enzim (MGDG, DGDG i TGDG). Com més elevat és el percentatge de DOPG present en el medi de reacció, més es veu afavorida la síntesi del DGDG, en detriment de la del MGDG. Pel que fa al tercer terme de galactosilació, TGDG, la seva quantitat no es veu alterada significativament per l'augment de la concentració de DOPG.

Per tal d'estudiar si es dona el mateix fenomen en el cas de GT-MG517, s'utilitza el mètode d'HPLC-MS desenvolupat en el grup i que permet establir en tot moment la naturalesa dels productes formats en la reacció enzimàtica. Es preparen dues reaccions en les condicions estàndards de 20 mM HEPES pH 8, 20 mM $MgCl_2$, 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG (3.7 mol %), 1 mM UDP-Glc, 0.099 μ M GT-MG517 i $T_{reacció} = 35$ °C. En una d'elles la concentració de lípid activador DOPG es manté en el valor habitual de 12.5 mM (37 mol %), mentre que en l'altra es canvia per 6 mM (17.8 mol %). Per tal de mantenir la concentració de molècules amfifíliques constant, en aquesta

segona reacció se substitueix el DOPG que manca per arribar a 12.5 mM pel lípid neutre DOPC, el qual es troba present en una concentració de 6.5 mM. El seguiment d'ambdues reaccions té lloc durant una hora.

Per a la primera reacció, aquella amb 12.5 mM DOPG (37 mol %), només és possible detectar la formació de MGlcDG. Per contra, en la reacció amb la meitat de lípid activador es detecten tant l'esmentat MGlcDG, el qual continua essent el producte majoritari, com DGlcDG, tal com es representa en la Figura 5.20. S'aprecia com, si bé la disminució de la quantitat d'activador afavoreix la formació del segon terme de glicosilació per part de l'enzim, no es tracta d'un efecte molt important, ja que la quantitat de DGlcDG produït és petita. Ara bé, aquest comportament demostra la influència del lípid aniónic DOPG, no únicament en la velocitat de la reacció enzimàtica, sinó també en la naturalesa dels productes lipídics sintetitzats per GT-MG517. Així, per quantitats de DOPG majors, s'afavoreix la formació de MGlcDG, el qual es tracta d'una molècula amb tendència a organitzar-se en fases no lamel·lars; mentre que per quantitats de DOPG més petites, l'enzim inicia la producció de DGlcDG, una molècula de caràcter més lamel·lar degut al seu cap polar més voluminós. Així doncs, l'entorn lipídic al voltant de la glicosiltransferasa n'influencia clarament l'activitat.

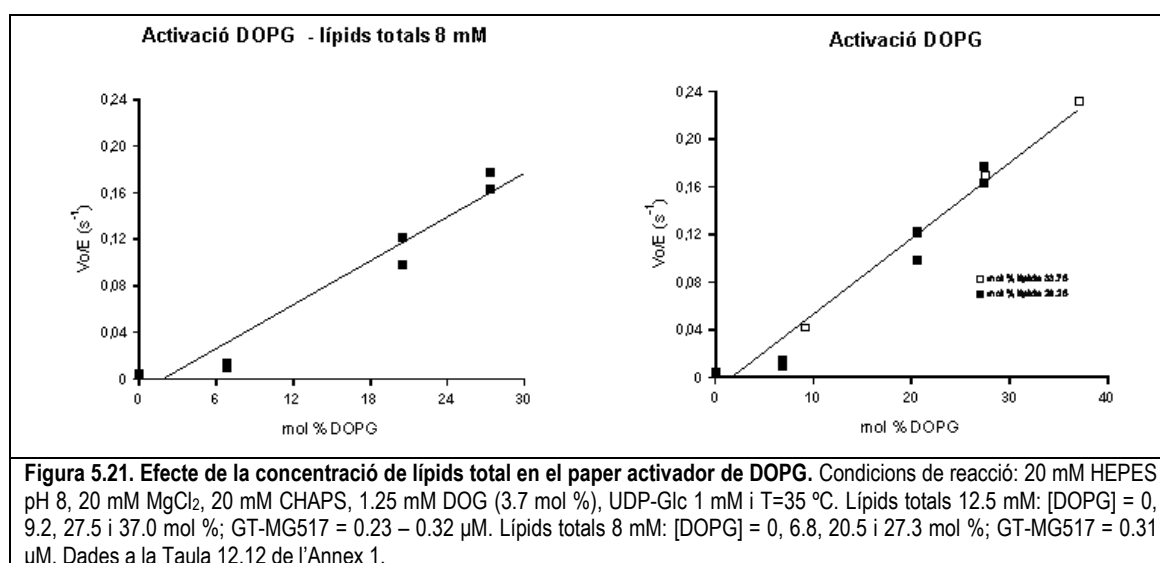


Els resultats anteriors demostren un comportament invers de GT-MG517 en comparació amb el de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae* MPN483 comentat anteriorment. A més, la influència de la concentració de DOPG present en l'entorn de l'enzim sobre la relació mono:di és molt més acusada, ja que doblar la quantitat d'activador implica invertir aquest valor (amb 10 mol% DOPG, M:D = 2.3; amb 20 mol% DOPG, M:D = 0.43) [Rosén Klement, M. *et al*, 2007].

Per tant, si bé ambdues glicosiltransferases es troben influenciades pel seu entorn lipídic, no ho estan de la mateixa manera. DOPG és una molècula activadora per tots dos casos, però per a GT-MG517 afavoreix la síntesi del primer terme de glicosilació, mentre que per a MPN483 n'afavoreix el segon.

D'altra banda, s'ha volgut determinar si l'efecte activador de DOPG es veu influenciat per la quantitat total de lípids present en l'extracte lipídic de la mescla de reacció.

Fins al moment la concentració total de lípids s'ha mantingut constant a 12.5 mM, de la mateixa manera que la concentració total de molècules amfifíliques no s'ha modificat del valor 33.25 mM. Per això, s'analitza la relació existent entre la velocitat inicial de diferents reaccions a condicions estàndard de 1 mM UDP-¹⁴C-Glc i 1.25 mM DOG (3.7 mol %) a una concentració total de lípids de 8 mM i una concentració de molècules amfifíliques de 29.25 mM.



Com es pot veure en el primer gràfic de la Figura 5.21, les dades que s'obtenen presenten una tendència lineal, de la mateixa manera que ho fan quan la concentració de lípids total és 12.5 mM. Per tant, l'activació de l'activitat enzimàtica per part del lípid aniònic DOPG es manté, tot i disminuir la quantitat de lípids total. A més, si es representen els dos conjunts de punts en un mateix gràfic (Figura 5.21, 2n gràfic), pot apreciar-se com la correlació entre les velocitats inicials i la concentració de DOPG és la mateixa independentment de la concentració de lípids total. Aquest fet implica que tal com s'ha descrit en bibliografia per les glicosiltransferases d'*Acholeplasma laidlawii* i de *Mycoplasma pneumoniae*, DOPC no afecta l'activitat enzimàtica de GT-MG517 i per tant, és adequat per a ser utilitzat com a lípid de matriu. D'altra banda, l'activació de l'enzim depèn únicament de la concentració de DOPG present en la reacció i no de la quantitat total de lípids.

5.5.4 Paràmetres cinètics de GT-MG517 com a diglicosildiacilglicerol sintasa

En aquest apartat s'inclou l'estudi i anàlisi de l'activitat de GT-MG517 quan actua com a diglicosildiacilglicerol sintasa.

En la "Introducció" del present capítol s'ha descrit la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* en estudi com un enzim processiu, entenent com a tal que és capaç de transferir en un primer pas un residu glicosil a un acceptor lipídic i en passos posteriors a un glicolípíd amb una cadena creixent d'unitats sacarídiques, ja que de moment no s'ha pogut demostrar que la successiva addició de sucres tingui lloc sense dissociació del complex enzim-acceptor. Així doncs, per tal d'obtenir els paràmetres cinètics de GT-MG517 quan actua com a disintasa (Figura 5.22) es treballa amb reaccions en què MGlcDG fa de substrat acceptor.

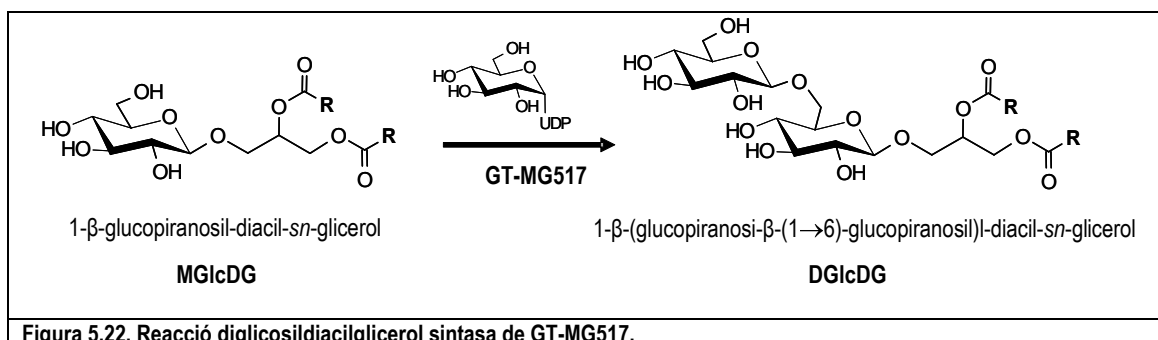


Figura 5.22. Reacció diglicosildiàcilglicerol sintasa de GT-MG517.

L'esmentat MGlcDG ha estat sintetitzat a partir d'un extracte proteic de cèl·lules d'*E.coli* les quals expressaven GT-MG517. L'esmentat extracte s'ha obtingut a partir del protocol 10.4.1 de la *Part Experimental*. Aquest s'ha usat com a font enzimàtica en una reacció preparativa sota les condicions descrites en el punt 10.4.2 de la *Part Experimental*. Els glicolípids formats s'han purificat mitjançant el protocol desenvolupat en el grup [Andrés, E.; Tesi doctoral, 2007], el qual inclou una columna de sílice i la seva separació a partir de l'ús seqüencial de diferents eluents: primer cloroform, després acetona i finalment MeOH (punt 10.4.3 de la *Part Experimental*). Les diferents fraccions que contenen MGlcDG s'uneixen i es comprova mitjançant el mètode cromatogràfic d'HPLC-MS descrit anteriorment que el contingut en DGlcDG com a impuresa és negligible.

5.5.4.1 Paràmetres cinètics aparents del substrat donador

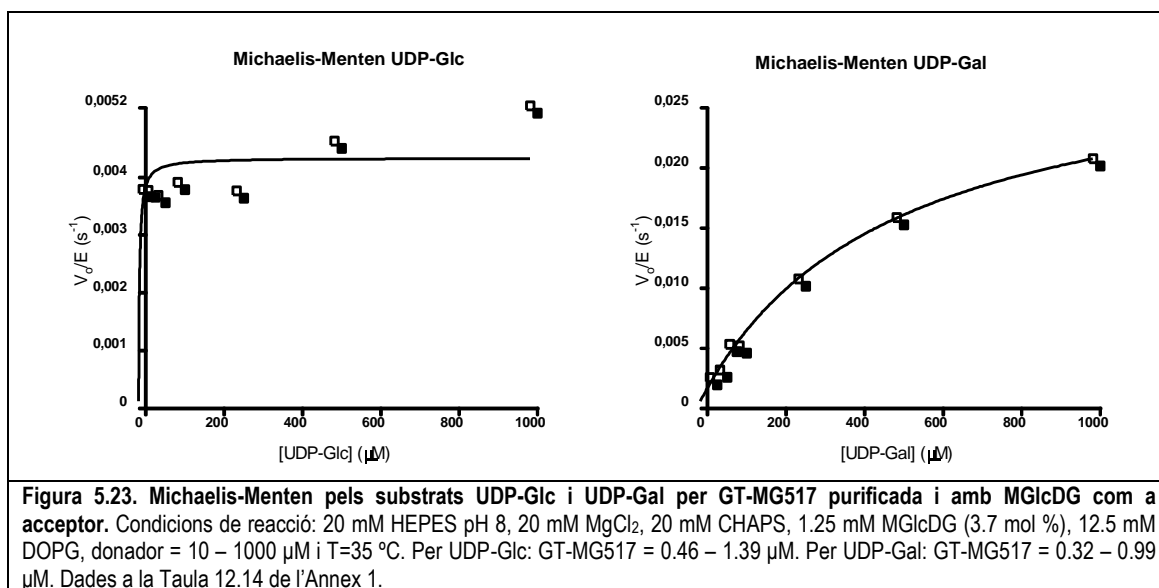
L'obtenció de paràmetres cinètics del substrat donador per a GT-MG517 amb MGlcDG com a acceptor s'ha dut a terme mitjançant l'assaig radiomètric en les condicions estàndard de 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 12.5 mM DOPG, 1.25 mM MGlcDG (3.7 mol %) i T_{reacció} = 35 °C. Com a substrats donadors s'han utilitzat UDP-Glc i UDP-Gal marcats radioactivament, variant les seves concentracions des de 10 – 1000 μM i treballant amb la relació radioactiu/no radioactiu 1/50 sempre que la concentració de donador fos igual o inferior a 50 μM. Com a control negatiu s'ha treballat amb reaccions en les quals no hi havia enzim i s'ha comprovat que al llarg de la corba de progrés no s'obtenia cap valor diferent al blanc.

En la Figura 5.23 s'observa que les dades per ambdós substrats donadors poden ajustar-se a un model de Michaelis-Menten, tot i que els valors de les constants, les quals es recullen en la Taula 5.15, presenten molt error, ja que l'activitat mesurada és molt baixa, especialment amb UDP-Glc.

Taula 5.15. Paràmetres cinètics aparents dels donadors UDP-Glc i UDP-Gal per a GT-MG517 purificada i MGlcDG com a acceptor.

Donador	K_M^{app} (μM)	k_{cat}^{app} (s^{-1})	$(k_{cat}/K_M)^{app}$ ($s^{-1} \cdot \mu M^{-1}$)
UDP-Glc	< 10	0.0042 ± 0.0003	n.d.
UDP-Gal	479 ± 50	0.030 ± 0.001	0.000063 ± 0.000009

Segons aquestes dades, l'afinitat de l'enzim pel substrat donador UDP-Glc és molt gran, molt més que la que presenta per UDP-Gal. En canvi, i seguint la mateixa tendència ja observada per a l'activitat monoglicosildiàcilglicerol sintasa de GT-MG517, la velocitat de reacció és superior (7 vegades) quan és aquest substrat donador el que es troba disponible per a l'enzim.



Si es comparen els paràmetres cinètics de GT-MG517 com a monoglicosildiàcilglicerol sintasa i com a diglicosildiàcilglicerol sintasa s'observa com la reacció monosintasa és entre 36 i 64 vegades superior que la de la reacció disintasa, en funció del substrat donador (veure Taula 5.16). Aquesta gran diferència permet afirmar que l'elongació del glicolipid té lloc pas a pas, amb la sortida del producte format del centre actiu de l'enzim abans de la seva entrada, aquest cop com a acceptor, per a la incorporació d'una nova unitat sacàridica. Aquesta mateixa hipòtesi es realitza per a la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae* [Rosén Klement, M. *et al*, 2007]. Per tant, si bé ambdós enzims són descrits com a processius, el terme processivitat no té el mateix sentit que en el cas d'enzims com les polimerases que sintetitzen l'ADN, les quals són capaces d'elongar una cadena de nucleòtids sense que el producte format en un pas dissociï de l'enzim abans de la unió del següent nucleòtid.

Taula 5.16. Resum de paràmetres cinètics aparents dels donadors UDP-Glc i UDP-Gal per a GT-MG517 purificada.

Donador	Accepter	K_M^{app} (μM)	k_{cat}^{app} (s^{-1})	$(k_{cat}/K_M)^{app}$ ($s^{-1} \cdot \mu M^{-1}$)
UDP-Glc	DOG	87 ± 16	0.27 ± 0.02	0.0031 ± 0.0008
UDP-Glc	MGlcDG	< 10	0.0042 ± 0.0003	n.d.
UDP-Gal	DOG	234 ± 45	1.10 ± 0.06	0.005 ± 0.001
UDP-Gal	MGlcDG	479 ± 50	0.030 ± 0.001	0.000063 ± 0.000009

En el cas de MPN483 l'esmentada processivitat no és possible si l'acceptor no presenta una galactosa en el seu extrem terminal. Així doncs, quan aquest enzim disposa de MGlcDG com a acceptor, és incapaç d'emprar-lo com a tal i unir-hi una glucosa o una galactosa. Aquesta és una diferència important respecte la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* en estudi en la present tesi, la qual sí que pot emprar, tal com s'ha demostrat anteriorment, MGlcDG com a acceptor.

GT-MG517 també pot usar com a acceptor un glicolípide que presenti a l'extrem terminal una galactosa, com ara MGDEG. A la Taula 5.17 es recullen valors d'activitat específica calculats per a diferents parelles de donador/acceptor en les condicions habituals de l'assaig radiomètric de 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 12.5 mM DOPG, 1.25 mM (3.7 mol %) acceptor, 1 mM donador, GT-MG517 = 0.99 – 1.39 µM i T_{reacció} = 35 °C.

Taula 5.17. Activitats específiques de diferents parelles de donador/acceptor per a GT-MG517 purificada.

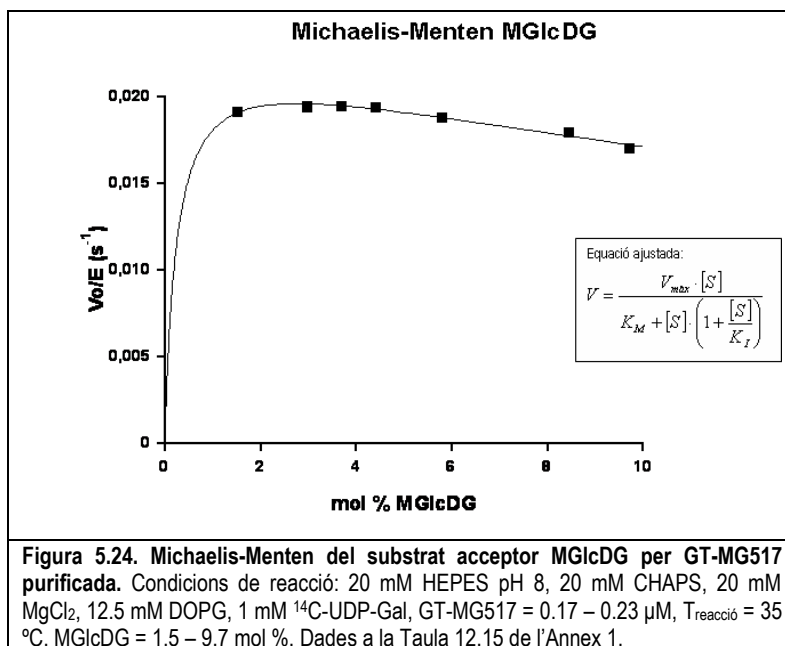
Donador	Acceptor	Act. esp (U/mg)	% Activitat
UDP-Gal	DOG	1.27	100
UDP-Gal	MGlcDOG	0.029	2.3
UDP-Gal	MGDEG	0.18	14.2
UDP-Glc	DOG	0.34	26.8
UDP-Glc	MGlcDOG	0.0073	0.6
UDP-Glc	MGDEG	0.030	2.4

A partir d'aquests valors es determina que amb qualsevol substrat acceptor, l'enzim presenta activitats específiques superiors si el substrat donador és UDP-Gal. L'acceptor preferit de GT-MG517 és el lípid DOG, però la glicosiltransferasa és capaç d'elongar, ja sigui amb una glucosa o amb una galactosa, glicolípid com el MGlcDG i el MGDEG, preferint en aquest cas el compost amb una galactosa a l'extrem no reductor.

5.5.4.2 Paràmetres cinètics aparents del substrat acceptor

Per tal que els paràmetres cinètics del donador establerts en el punt anterior puguin ser considerats de forma real, cal demostrar que la concentració de substrat acceptor emprada per tal d'obtenir-los satura l'enzim. Per aquest motiu, es determinen els paràmetres cinètics de l'acceptor MGlcDG mitjançant l'assaig radiomètric amb les condicions de 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 12.5 mM DOPG, 1 mM UDP-¹⁴C-Gal, GT-MG517 = 0.17 – 0.23 µM i T_{reacció} = 35 °C. Les concentracions d'acceptor es varien des de 0.5 – 3.5 mM. Cal que aquesta variació no sigui molt significativa per tal d'assegurar una concentració de molècules amfifíliques en la reacció el més constant possible. En aquest cas, la variació ha estat des d'un màxim de 36 mM fins a un mínim de 33 mM.

Els valors de velocitat inicial obtinguts per a les diferents concentracions de MGlcDG s'ajusten a una equació de Michaelis-Menten a la qual és necessari incloure un terme d'inhibició per substrat, tal com es mostra a la Figura 5.24. Els paràmetres cinètics es recullen a la Taula 5.18, tant expressats en percentatge molar com en molaritat per facilitar comparacions posteriors.



El primer que es conclou a partir de les dades és que els paràmetres cinètics dels donadors s'han obtingut en condicions saturants de l'acceptor per a l'enzim.

Taula 5.18. Paràmetres cinètics aparents de l'acceptor MGlcDG per a GT-MG517 purificada.

K_M^{app} (mol %)	k_{cat}^{app} (s ⁻¹)	$(k_{cat}/K_M)^{app}$ (s ⁻¹ · mol % ⁻¹)	K_I (mol %)
0.25 ± 0.06	0.0231 ± 0.0007	0.09 ± 0.02	30 ± 4
K_M^{app} (μM)	k_{cat}^{app} (s ⁻¹)	$(k_{cat}/K_M)^{app}$ (s ⁻¹ · μM ⁻¹)	K_I (mM)
75 ± 16	0.0227 ± 0.0006	0.00030 ± 0.00007	12 ± 1

D'altra banda, la comparació de les constants cinètiques de MGlcDG amb les de DOG (Taula 5.13) posa de manifest que l'afinitat de GT-MG517 és superior per al primer substrat, en concret 3.5 vegades més gran. Per contra, la velocitat de conversió enzimàtica és major en el cas de DOG com a acceptor. La diferència en aquest paràmetre és molt acusada, ja que k_{cat} per a DOG és gairebé 50 vegades superior que el mateix valor per a MGlcDG. La combinació d'ambdós factors provoca que l'eficiència catalítica sigui més de 10 vegades més gran per DOG. Per tant, queda demostrat que la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* prefereix com a substrat acceptor el lípid DOG.

5.5.5 Comparativa respecte les glicosiltransferases d'*Acholeplasma laidlawii*

Si bé es tracta d'enzims diferents, els estudis cinètics més amplis realitzats sobre glicosiltransferases de micoplasmes corresponen a la MGlcDG sintasa i la DGlcDG sintasa d'*Acholeplasma laidlawii*, els quals s'han discutit breument en la "Introducció" d'aquest capítol. Cal recordar que *Acholeplasma laidlawii* disposa de dos enzims diferents per a produir els mateixos glicolípids que *Mycoplasma genitalium* sintetitza mitjançant GT-MG517. Tot i això, en la present tesi s'han pogut determinar els paràmetres de GT-MG517 com a monosintasa i com a disintasa

per separat i, per tant, és possible comparar-los amb els de les glicosiltransferases d'*Acholeplasma laidlawii*, els quals es presenten a la Taula 5.19.

Taula 5.19. Dades cinètiques de les sintases d'*Acholeplasma laidlawii* per substrat donador.

Enzim	V _{màx.} (nmol/h)	K _M (mM)
MGlcDG Sintasa ⁽¹⁾	3.18 ± 0.09	0.37 ± 0.04
DGlcDG Sintasa ⁽²⁾	19	0.14

⁽¹⁾ [Karlsson, O., *et al*, 1997]. Condicions de reacció: 100 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 9.3 mM DOPG, 0.24 mM DOG, 0 – 3.75 mM UDP-¹⁴C-Glc.

⁽²⁾ [Vikström, S., *et al*, 1999]. Condicions de reacció: 100 mM Tris-malat pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 10.5 mM DOPG, 0.6 mM MGlcDG, 0 – 5 mM UDP-¹⁴C-Glc.

Els enzims d'*Acholeplasma* utilitzen únicament UDP-Glc com a donador. Per tant, les dades a comparar corresponen a les de GT-MG517 amb aquest substrat.

Es comprova que, d'una banda, l'afinitat de l'enzim de *Mycoplasma genitalium* per l'UDP-Glc és quatre vegades superior a la de l'enzim d'*Acholeplasma* (K_M GT-MG517 = 87 µM, K_M MGlcDG sintasa = 370 µM). També la velocitat enzimàtica és superior per a GT-MG517, en concret més de sis vegades més gran (V_{màx} GT-MG517 = 21 nmol/h – valor calculat a partir de l'activitat específica de referència, V_{màx} MGlcDG sintasa = 3.18 nmol/h). Sembla doncs que la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* ha evolucionat cap a una eficiència enzimàtica millor, de la mateixa manera que la reducció del genoma en comparació al d'*Acholeplasma* ha provocat l'evolució cap a un enzim processiu en substitució de les dues activitats presents en aquest.

La disintasa d'*Acholeplasma* presenta una afinitat superior pel substrat donador que la seva corresponent monosintasa. En *Mycoplasma genitalium* ocorre exactament igual, però d'una manera molt més acusada, ja que l'afinitat de la disintasa per UDP-Glc és enorme, en comparació amb la de la monosintasa. Si es valoren les K_M d'ambdues disintases (K_M GT-MG517 < 10 µM, K_M MGlcDG sintasa = 140 µM), és clar que l'afinitat per UDP-Glc és molt més gran en el cas de *Mycoplasma genitalium*. D'altra banda, la velocitat enzimàtica de la disintasa d'*Acholeplasma* és unes sis vegades major en comparació amb la de la corresponent monosintasa. Per GT-MG517 ocorre al revés, ja que la rapidesa en la formació de productes és molt més gran per la seva monosintasa. La comparativa entre les velocitats enzimàtiques d'ambdues disintases (V_{màx} GT-MG517 = 2.8 nmol/h – valor calculat a partir de l'activitat específica, V_{màx} MGlcDG sintasa = 19 nmol/h) afavoreix l'enzim d'*Acholeplasma*, el qual és molt més ràpid. Segurament les diferències que s'observen entre les dues glicosiltransferases s'expliquen per la "processivitat" de GT-MG517, la qual supera una menor velocitat catalítica de la seva activitat diglucosildiàcilglicerol sintasa a partir d'una afinitat molt elevada pel substrat donador.

Pel que fa al comportament dels enzims d'*Acholeplasma laidlawii* davant els seus corresponents substrats acceptors, DOG en el cas de la monosintasa i MGlcDG en el cas de la disintasa, cal dir que en ambdós casos s'ajusten a cinètiques cooperatives, en les quals l'augment en la concentració del substrat acceptor incrementa l'activitat enzimàtica. Aquesta és una diferència respecte l'enzim de *Mycoplasma genitalium*, el qual presenta cinètiques del tipus Michaelis-Menten tant quan s'analitza com a monosintasa com quan es fa com a disintasa. Això

indica que els substrats acceptors actuen com a activadors per als enzims d'*Acholeplasma*, cosa que no ocorre per a la proteïna de *Mycoplasma genitalium*.

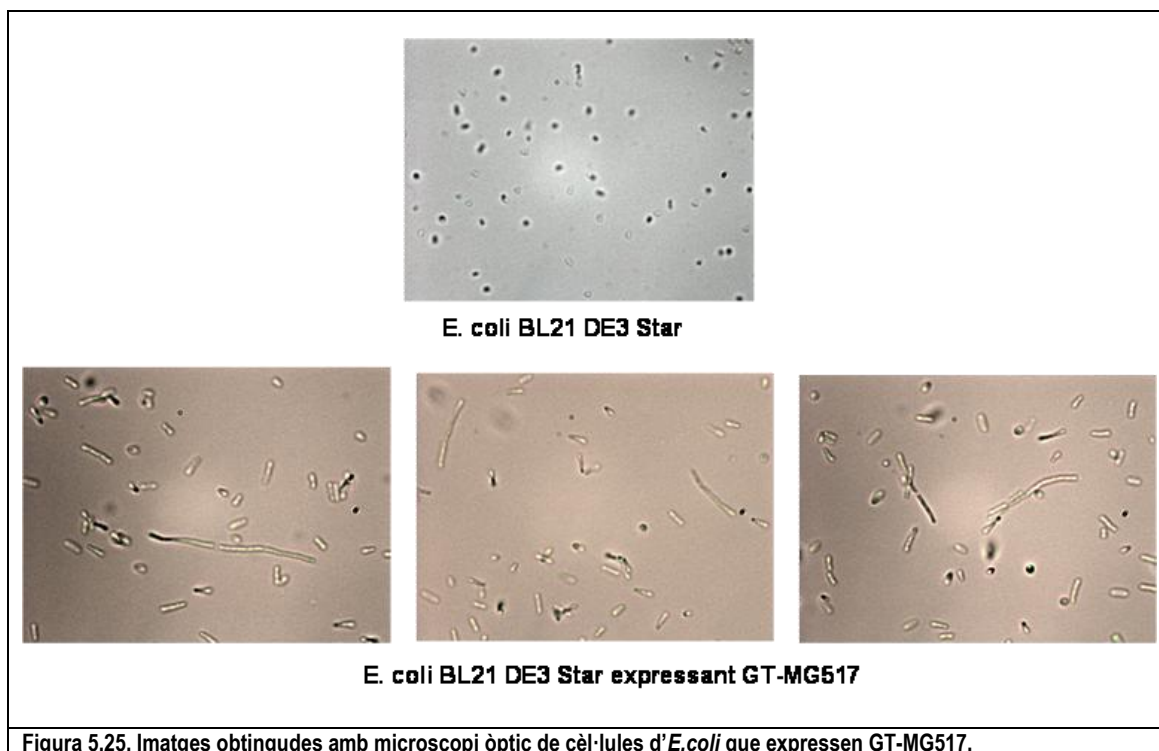
5.5.6 Comparativa respecte la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae* MPN483

Com ja s'ha comentat a la "Introducció" del present capítol, es creu que la funció que GT-MG517 té en *Mycoplasma genitalium* és realitzada en *Mycoplasma pneumoniae* per MPN483. La comparativa entre ambdues glicosiltransferases és interessant, ja que per la proximitat evolutiva dels dos micoplasmes s'espera que presentin moltes característiques en comú.

In vivo, MPN483 produeix bàsicament galactolípid, tot i que *Mycoplasma pneumoniae* és incapaç d'incorporar galactosa, ja sigui perquè no disposa d'un sistema de transport a través de la membrana adequat o bé perquè disposa d'una epimerasa que transforma glucosa, la qual sí que és incorporada, en galactosa [Rosén Klement, M. *et al*, 2007]. En el cas de GT-MG517 encara es desconeix quina és la seva especificitat *in vivo*, ja que la dificultat per a l'obtenció de quantitats importants de biomassa ha fet impossible fins al moment l'anàlisi dels glicolípid produïts per *Mycoplasma genitalium*.

En canvi, *in vitro*, emprant com a font enzimàtica membranes de cèl·lules d'*E.coli* que expressen MPN483, es determina que la glicosiltransferasa de *M. pneumoniae* prefereix com a substrat donador UDP-Gal respecte UDP-Glc, en concret quan el substrat acceptor és MGDG, genera un 30% més de producte glicosilat amb UDP-Gal [Rosén Klement, M. *et al*, 2007]. En el cas de GT-MG517 s'ha determinat que tant quan es troba en extracte com quan està purificada no presenta una preferència per cap dels dos donadors testats, ja que en termes d'eficiència catalítica (k_{cat}/K_M) no hi ha diferències entre ells. Ara bé, en termes de velocitat catalítica sí que s'observen valors més elevats quan UDP-Gal actua de substrat donador, tot i que l'afinitat de l'enzim per ell sigui menor que per UDP-Glc. S'esperaria doncs que GT-MG517 sintetitzés principalment galactolípid. Per contra, quan s'han emprat membranes de cèl·lules d'*E.coli* que l'expressen de forma recombinant com a font enzimàtica per a una reacció preparativa amb la finalitat d'aïllar i analitzar per RMN els seus productes de síntesi, s'han recuperat únicament glucolípid [Andrés, E.; Tesi doctoral, 2007]. Tal com se suggereix en el cas de MPN483, on el principal glicolípid que es recupera en les mateixes condicions conté una unitat de glucosa i una de galactosa, aquest canvi podria ser degut a les concentracions relatives entre UDP-Glc i UDP-Gal que es troben en les cèl·lules d'*E.coli*, les quals serien diferents a les que ocorren en *Mycoplasma pneumoniae* i també en *Mycoplasma genitalium*.

Una característica comú a les dues glicosiltransferases és que ambdues són tòxiques per a les cèl·lules d'*E.coli* que les expressen. Aquesta toxicitat consisteix en una elongació clara de les cèl·lules, les quals segurament perden en part la seva capacitat de divisió quan els glicolípid de nova síntesi produïts per GT-MG517 o MPN483 ocupen el seu lloc en les membranes. En la Figura 5.25 es presenta l'esmentat efecte en el cas de GT-MG517.



Una diferència rellevant entre GT-MG517 i MPN483 és la comentada anteriorment en aquest capítol, segons la qual la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae* no pot utilitzar com a substrat acceptor i per tant, elongar la cadena sacarídica, un compost que a l'extrem terminal d'aquesta no tingui una unitat de galactosa. Per contra, GT-MG517 sí que pot acceptar glicolípid que a l'extrem tinguin una glucosa, com és el cas del MGlcDG, tot i que també cal dir que són millors acceptores molècules amb una galactosa com el MGDEG.

5.6 Conclusions

El treball presentat en aquest capítol representa el primer estudi cinètic realitzat per a la glicosiltransferasa GT-MG517 de *Mycoplasma genitalium* a nivell quantitatiu.

L'esmentat estudi ha estat possible gràcies al desenvolupament previ d'un assaig radiomètric en el qual se segueixen les reaccions enzimàtiques en un sistema de miscel·les mixtes. Aquestes miscel·les contenen el substrat acceptor de l'enzim, el qual és de naturalesa lipídica, i lípids de matriu com el DOPG i el DOPC. A més, aporten l'entorn hidrofòbic necessari per acomodar la glicosiltransferasa, de forma que aquesta es troba en una situació molt semblant a la seva pròpia *in vivo* i això li permet ser funcional.

A partir de l'assaig radiomètric s'ha pogut analitzar l'activitat de GT-MG517, tant en extractes proteics com quan la proteïna es troba purificada. Mitjançant un assaig qualitatiu per TLC desenvolupat prèviament en el grup, es coneixia la "processivitat" de l'enzim, és a dir, la seva capacitat d'actuar com a monoglicosildiàcilglicerol sintasa i també com a diglicosildiàcilglicerol sintasa. Amb la combinació de l'assaig radiomètric i un mètode d'HPLC-MS per a la separació i quantificació de glicolípid desenvolupat també en el grup, ha sigut possible caracteritzar cinèticament

ambdues activitats de GT-MG517, treballant amb dos substrats donadors diferents, UDP-Glc i UDP-Gal. A la Taula 5.20 es presenta un resum de tots els paràmetres cinètics obtinguts per a l'enzim purificat, classificats segons si són del substrat donador o de l'acceptor.

Taula 5.20. Resum dels paràmetres cinètics per a GT-MG517 purificada.

	Donador	Acceptor	K_M^{app} (μM)	k_{cat}^{app} (s^{-1})	$(k_{cat}/K_M)^{app}$ ($s^{-1} \cdot \mu M^{-1}$)
Paràmetres del donador	UDP-Glc	DOG	87 ± 16	0.27 ± 0.02	0.0031 ± 0.0008
	UDP-Gal	DOG	234 ± 45	1.10 ± 0.06	0.005 ± 0.001
	UDP-Glc	MGlcDOG	< 10	0.0042 ± 0.0003	n.d.
	UDP-Gal	MGlcDOG	479 ± 50	0.030 ± 0.001	0.000063 ± 0.000009
Paràmetres de l'acceptor	UDP-Gal	DOG	266 ± 92	1.1 ± 0.1	0.004 ± 0.002
	UDP-Gal	MGlcDOG	75 ± 16	0.0227 ± 0.0006	0.00030 ± 0.00007

Les dades anteriors demostren que GT-MG517 pot transferir un sucre, Glc o Gal, a una molècula principalment hidrofòbica, com és el DOG, i a una molècula molt més hidrofílica, com el MGlcDG. Ambdós compostos però posseeixen un alcohol primari sobre el qual té lloc la transferència creant l'enllaç $\beta(1 \rightarrow 6)$. Totes les glicosiltransferases "processives" comparteixen la mateixa especificitat, com és el cas de les de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* o la glicosiltransferasa de *Mycoplasma pneumoniae* MPN483. En canvi, *Acholeplasma laidlawii* presenta una especificitat diferent, $\alpha(1 \rightarrow 2)$, i disposa de dos enzims diferents per a la síntesi dels dos glicolípids de les seves membranes.

D'altra banda, s'ha demostrat que la presència del lípid aniònic DOPG és necessària per tal que GT-MG517 sigui activa. També s'ha demostrat que l'esmentat lípid es comporta com a activador de l'activitat enzimàtica i que a més, és capaç de modificar la relació MGlcDG/DGlcDG que sintetitza l'enzim en funció de la seva concentració present en el medi de reacció.

Part II

Capítol 6: Anàlisi funcional de l'extrem

C-terminal de GT-MQ517

6 Anàlisi funcional de l'extrem C-terminal de GT-MG517

6.1 Introducció

Moltes glicosiltransferases són proteïnes de membrana bitòpiques, és a dir, que posseeixen una hèlix que s'expandeix al llarg de tot el gruix de la bicapa lipídica. De fet, existeix una classificació que les divideix en proteïnes de membrana tipus I i proteïnes de membrana tipus II, segons la qual les primeres tenen un domini globular a l'extrem N-terminal situat al lumen de l'aparell de Golgi, seguit d'una zona que fa d'espaiador i s'anomena *stem region*, l'hèlix transmembrana i finalment una petita cua a l'extrem C-terminal situada al citosol de la cèl·lula. En les proteïnes de membrana tipus II s'inverteix la configuració. Així, l'extrem N-terminal es troba al citosol i està format per uns pocs aminoàcids, a continuació es troba l'hèlix transmembrana que s'expandeix fins al lumen de l'aparell de Golgi, on es troba la *stem region* i el domini globular de l'enzim, format pel seu extrem C-terminal (Figura 6.1).

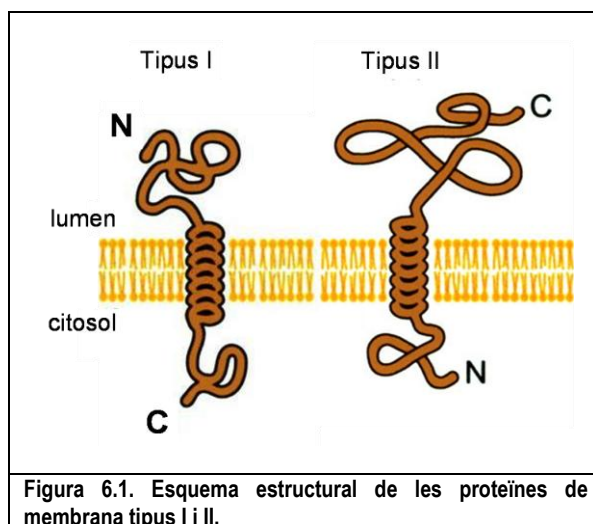


Figura 6.1. Esquema estructural de les proteïnes de membrana tipus I i II.

Es coneix que la correcta localització de les glicosiltransferases de l'aparell de Golgi a la membrana del corresponent compartiment de l'òrganul cel·lular es troba determinada per senyals codificades en la seqüència peptídica de les parts citoplasmàtica, hèlix transmembrana i *stem region* [Grabenhorst, E. i Conradt, H., 1999]. Aquest fet és crucial per a la seva funció, la qual està totalment subordinada a la seva localització. Ara bé, es coneix també que moltes glicosiltransferases poden ser expressades de forma soluble a partir de l'eliminació de la part citosòlica, el domini transmembrana i la *stem region*, sense modificar de forma important la seva activitat. Així és com s'han estudiat nombroses glicosiltransferases humanes, com UDP-glucuroniltransferases [Meech, R. i Mackenzie, P., 1997], les fucosiltransferases III i V [Xu, Z., *et al*, 1996; Costa, J., *et al*, 1997; Gallet, P., *et al*, 1998] o la α -1,3-galactosiltransferasa [Gastinel, L., *et al*, 2001].

El tall de la seqüència d'aminoàcids que genera la forma soluble d'una glicosiltransferasa es realitza normalment a la *stem region*, ja que aquesta no té una estructura secundària definida i d'aquesta manera s'evita la desestabilització de la proteïna. Conèixer la ubicació de l'esmentada *stem region* dins de la seqüència de la proteïna és quelcom poc difícil a partir d'eines bioinformàtiques que prediuen dominis catalítics i hèlix transmembrana. Per això,

l'expressió soluble de glicosiltransferases que completes es descriurien com proteïnes de membrana és l'opció més practicada experimentalment.

Com ja s'ha dit al llarg del treball, es tenen moltes evidències que GT-MG517 és una proteïna associada a membrana, tant *in vivo* en *Mycoplasma genitalium*, com quan s'expressa de forma recombinant en *E. coli*. Aquest fet planteja dificultats a l'hora de la seva expressió i purificació, tal com s'ha presentat en el Capítol 4 de la present tesi. No obstant, la inexistència en la seqüència de GT-MG517 de dominis transmembrana segons totes les eines bioinformàtiques de predicció provades, fa difícil plantejar-se un tall equivalent al que s'efectua en les glicosiltransferases d'organismes eucariotes descrites anteriorment. Tot i això, és clar que l'eliminació de les zones de GT-MG517 que interactuen amb la membrana facilitaria de forma important el seu procés de purificació.

L'associació a la membrana és una característica comú a altres glicosiltransferases que s'encarreguen de la síntesi de glicolípid, com s'ha descrit per la MGlcDG sintasa i la DGlcDG sintasa d'*Acholeplasma laidlawii* [Karlsson, O., *et al*, 1997; Vikström, S., *et al*, 1999] o per a MPN483, la glicosiltransferasa equivalent a GT-MG517 de *Mycoplasma pneumoniae* [Rosén Klement, M., *et al*, 2007]. No obstant, la unió entre aquestes proteïnes i la membrana no té lloc mitjançant la inserció de part de la cadena peptídica a la bicapa lipídica, com ocorre amb les glicosiltransferases d'organismes eucariotes, sinó que es tracta més aviat d'una interacció electrostàtica entre aminoàcids carregats positivament i lípids aniónics de la membrana. De fet, aquests compostos s'ha demostrat que activen l'acció dels enzims d'*Acholeplasma*, del de *Mycoplasma pneumoniae* i en la present tesi, també de GT-MG517. Per als enzims d'*Acholeplasma*, pels quals s'han realitzat amplis estudis sobre aquest tema, s'ha demostrat que la interacció amb la membrana constitueix un mecanisme de regulació de l'activitat enzimàtica, ja que mitjançant la unió, els enzims noten propietats d'aquesta tals com la densitat de càrrega superficial o la curvatura i així modulen la seva acció per mantenir la relació MGlcDG/DGlcDG necessària en tot moment a la bicapa [Lindblom, G., *et al*, 1986; Andersson, A. S., *et al*, 1996].

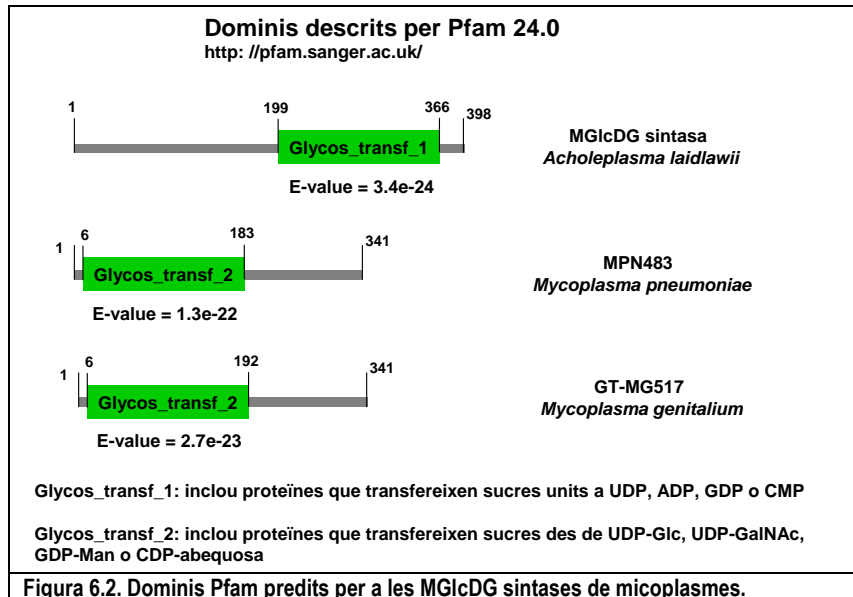
Per tal de determinar si l'activitat enzimàtica de GT-MG517 es troba influenciada de la mateixa forma, cal primer establir quina o quines són les zones de la proteïna que es troben associades a la membrana. Un cop es conegui aquesta informació, serà possible aprofundir en el mecanisme d'associació i en el de regulació de l'activitat glicosiltransferasa per part tant dels components de la membrana com de les seves propietats físiques.

No es disposa d'un model estructural per a GT-MG517 que pugui aportar indicis sobre els punts d'associació amb la membrana. No obstant, sí que existeix alguna informació derivada dels enzims d'*Acholeplasma*, la qual s'utilitzarà com a base per a una anàlisi bioinformàtica de la seqüència de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium*.

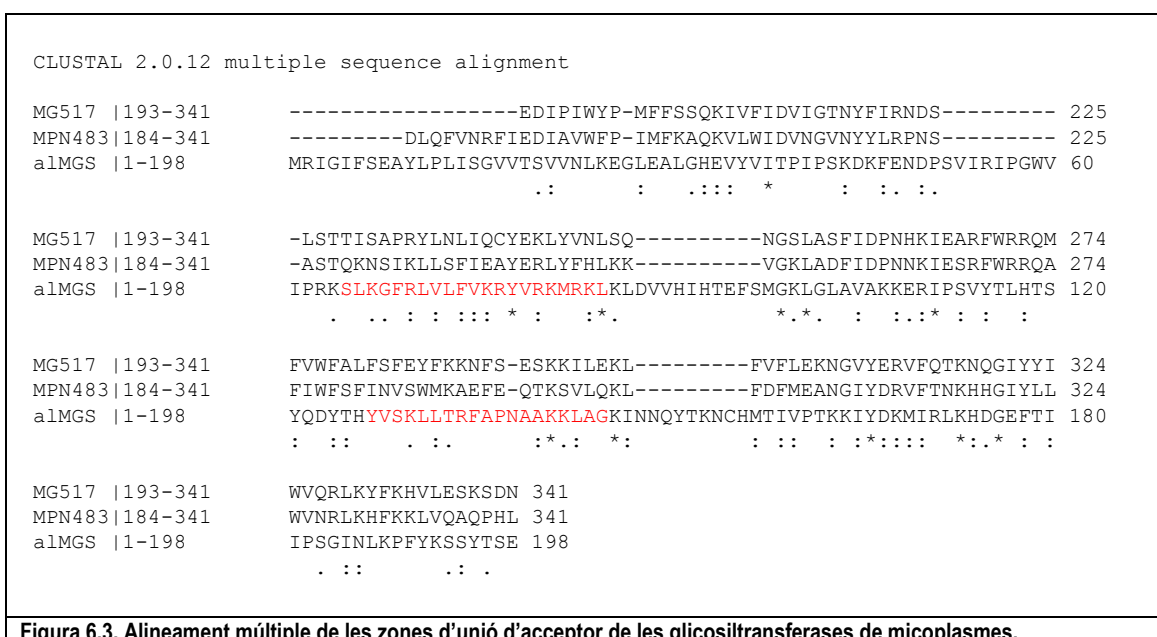
6.1.1 Anàlisi bioinformàtica de la seqüència de GT-MG517

La interacció amb la membrana per part de la MGlcDG sintasa d'*Acholeplasma* té lloc mitjançant una hèlix amfipàtica de la seqüència d'aminoàcids situada prop del punt d'unió del substrat acceptor [Lind, J., *et al*, 2007], el qual es troba a l'extrem N-terminal de la proteïna. Per la seva banda, el domini catalític, descrit com el punt d'unió del substrat donador, el qual és un nucleòtid unit a sucre, se situa a l'extrem C-terminal de la seqüència. Aquesta

configuració és inversa a la descrita tant per a MPN483 com per a GT-MG517, proteïnes que tenen el domini d'unió per nucleòtid a l'extrem N-terminal i el suposat domini d'unió per acceptor a l'extrem C-terminal, tal com es prediu amb l'eina bioinformàtica Pfam i es mostra en la Figura 6.2. Cal dir que Pfam és una base de dades amb gairebé 12000 famílies de proteïnes diferents (Octubre 2009) representades per alineaments multisequència i HMMs (*Hidden Markov Models*). Quan una seqüència proteica objectiu es compara amb totes les famílies, el programa la classifica en alguna d'elles, segons la similitud existent.

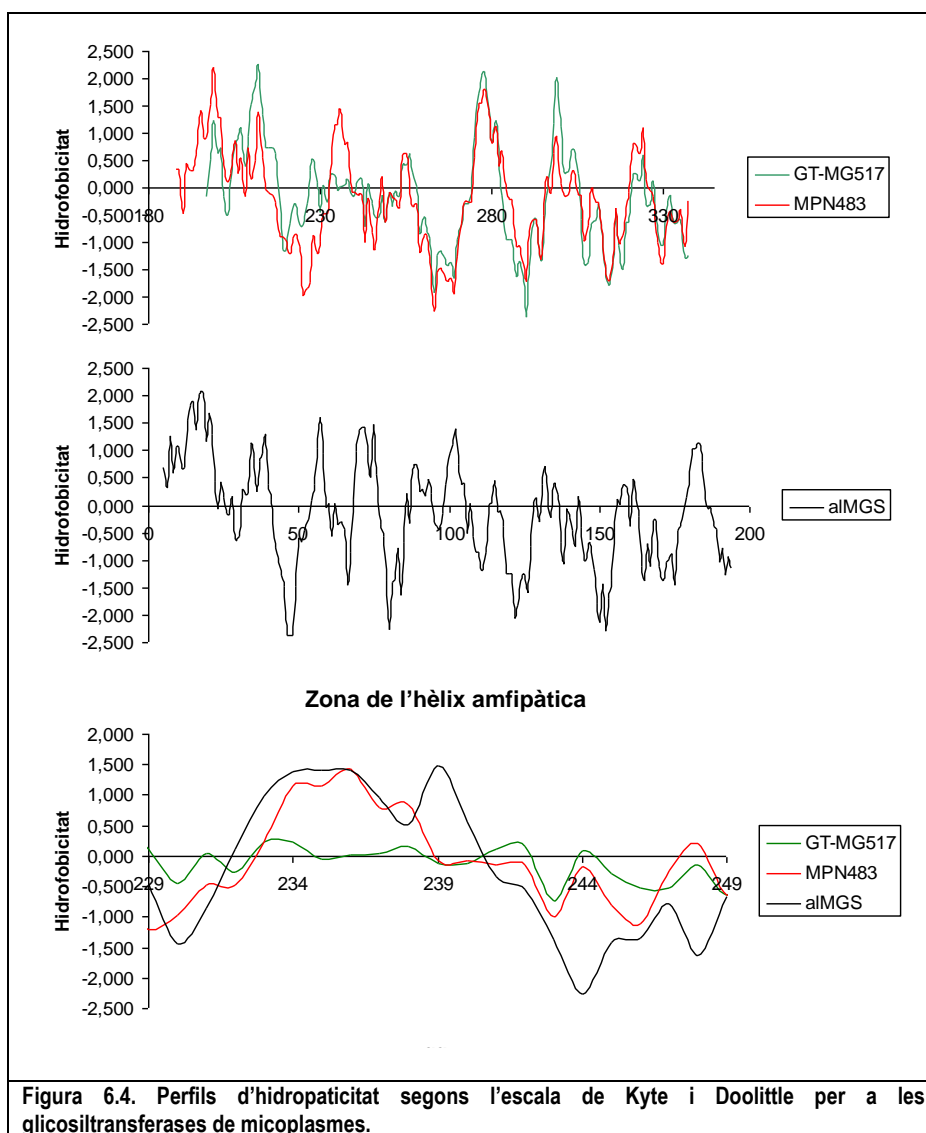


Per tal d'establir l'existència d'una hèlix amfipàtica equivalent en la seqüència de GT-MG517 s'ha realitzat un alineament entre les tres zones teòriques d'unió d'acceptor de les tres proteïnes: alMGS (1-198), MPN483 (184-341) i GT-MG517 (193-341), utilitzant l'eina bioinformàtica d'alineaments múltiples CLUSTAL 2.0.12. A la Figura 6.3 es mostren els resultats obtinguts.



Les seqüències marcades en vermell de la MGlcDG sintasa d'*Acholeplasma* corresponen a dues hèlix amfipàtiques, de les quals la primera d'elles és la que s'ha comprovat experimentalment que és capaç d'interaccionar amb membranes [Lind, J., *et al*, 2007]. Pot observar-se com aquesta s'ha conservat en gran part en les seqüències tant de MPN483 com GT-MG517.

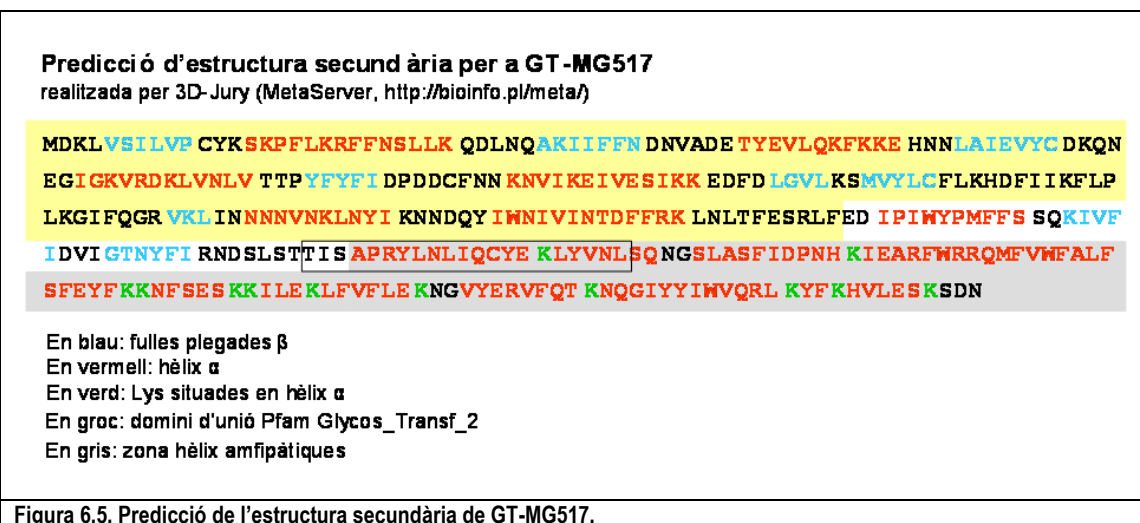
Per aquestes mateixes zones de les glicosiltransferases s'ha realitzat un anàlisi de la seva hidropaticitat. De les múltiples escales per avaluar aquesta propietat que existeixen, la més habitual és l'escala de Kyte i Doolittle, segons la qual com més hidrofòbic és un aminoàcid, més elevat és el valor que li correspon en l'escala. Així, l'aminoàcid més hidrofòbic és l'Ile amb 4.5 i el més hidrofílic és Arg amb -4.5. A la Figura 6.4 es presenten les superposicions dels perfils d'hidropaticitat per a les glicosiltransferases de *Mycoplasma pneumoniae* i *Mycoplasma genitalium*, el perfil d'hidropaticitat per a la glicosiltransferasa d'*Acholeplasma laidlawii* i la superposició dels tres perfils per a la zona de l'hèlix amfipàtica marcada en vermell a la Figura 6.3.



Pot observar-se com en tots els casos es tracta de zones amfipàtiques, ja que el perfil passa de valors hidrofòbics a valors hidrofílics en pocs aminoàcids. Ara bé, a la zona de l'hèlix amfipàtica de la MGlcDG sintasa d'*Acholeplasma*,

sembla que GT-MG517 no presenta aquesta característica, ja que la línia del perfil transcorre constant al voltant de zero. Per contra, MPN483 té un perfil molt més semblant al de l'hèlix d'*Acholeplasma*.

Pel que fa a l'estructura secundària de GT-MG517, la predicció realitzada mitjançant eines bioinformàtiques s'ha presentat anteriorment en el Capítol 4. A tall de recordatori es repeteix a la Figura 6.5. Mentre que a la zona N-terminal del teòric domini d'unió del donador s'alternen zones de fulla plegada β amb zones d'hèlix α , estructura denominada plegament de Rossmann i típica de proteïnes que uneixen nucleòtids, com és el cas de GT-MG517; a la zona C-terminal hi predominen llargues hèlix α , les quals si es considera el perfil d'hidropaticitat de la Figura 6.4, poden considerar-se amfipàtiques i, per tant, ser considerades com el possible punt d'unió de la proteïna amb la membrana plasmàtica.



La zona de GT-MG517 que s'alinea amb l'hèlix amfipàtica de la MGlcDG sintasa d'*Acholeplasma*, la qual es troba marcada amb un requadre a la Figura 6.5, es prediu majoritàriament com una hèlix α . Ara bé, segons el perfil d'hidropaticitat, no es tracta d'una hèlix amfipàtica, fet que genera dubtes a l'hora de considerar-la un possible punt d'interacció amb la membrana.

Una segona característica comuna a les quatre glicosiltransferases de micoplasmes és el seu elevat punt isoelèctric (pI), valor que encara augmenta més si només es considera la teòrica zona d'unió a membrana, és a dir, l'extrem N-terminal per a les sintases d'*Acholeplasma* i l'extrem C-terminal per a la de *M. pneumoniae* i la de *M. genitalium*.

Taula 6.1. Punt isoelèctric de les glicosiltransferases de micoplasmes.

Glicosiltransferasa	pI (completa)	pI (N-term)	pI (C-term)
aMGS	9.5	9.8	5.5
aDGS	9.4	10.0	6.4
MPN483	8.9	5.7	9.8
GT-MG517	9.2	9.0	9.4

Aquests valors (Taula 6.1) constitueixen una diferència respecte les glicosiltransferases solubles, les quals en general posseeixen uns pI menors [Lind, J., *et al*, 2007].

Els valors tan elevats de pI tenen la seva explicació en la presència a la seqüència d'un elevat nombre d'aminoàcids carregats positivament, d'entre els que destaquen les Lys (K), marcades amb verd a la Figura 6.5 només aquelles de la zona C-terminal de la proteïna. Aquestes s'han proposat com a punts d'unió amb la membrana plasmàtica, ja que amb la seva càrrega positiva són capaces d'establir interaccions electrostàtiques amb els fosfolípids aniónics [Lind, J., *et al*, 2007].

Amb l'objectiu d'estudiar la interacció amb la membrana de l'extrem C-terminal de GT-MG517 i com afecta aquesta a l'activitat de la proteïna, es decideix obtenir diferents formes truncades de la proteïna. Els punts de tall escollits són precisament les esmentades Lys. En concret, i per evitar l'eliminació d'un nombre molt gran d'aminoàcids, es comença amb 6 formes truncades obtingudes a partir de talls en les primeres 6 Lys de la seqüència, des de l'extrem C-terminal. A més, s'inclou una setena forma truncada la qual consisteix únicament en el domini d'unió predit per Pfam i considerat el domini catalític. A la Figura 6.6 es presenta la seqüència de GT-MG517 amb els punts de tall marcats i a la Taula 6.2 es resumeixen les formes truncades que aquests generaran.

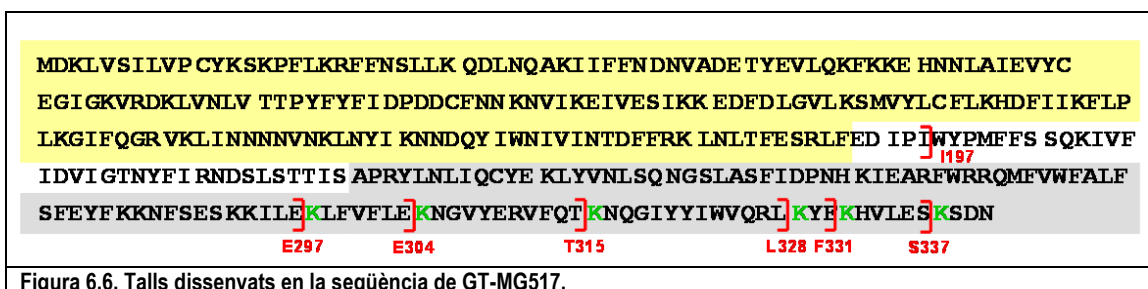


Figura 6.6. Talls dissenyats en la seqüència de GT-MG517.

Taula 6.2. Formes truncades de GT-MG517.

Forma truncada	Aminoàcids presents	Aminoàcids eliminats
FT1 - GT-MG517(1-337)	1 - 337	4
FT2 - GT-MG517(1-331)	1 - 331	10
FT3 - GT-MG517(1-328)	1 - 328	13
FT4 - GT-MG517(1-315)	1 - 315	26
FT5 - GT-MG517(1-304)	1 - 304	37
FT6 - GT-MG517(1-297)	1 - 297	44
FT7 - GT-MG517(1-197)	1 - 197	144

S'observa com per a la forma truncada corresponent al domini d'unió de nucleòtid, GT-MG517(1-197), es deixen alguns aminoàcids més per no desestabilitzar l'estructura. D'altra banda, tots els altres talls es troben en zones en les quals es prediuen hèlix α , però en aquest cas, l'objectiu ja és l'observació de les afectacions en l'activitat enzimàtica d'una desestabilització de la zona.

A continuació, es descriu el procés d'obtenció de les formes truncades anteriors, des de nivell d'ADN fins a la seva expressió en *E.coli* com a proteïnes recombinants, la confirmació de la seva identitat per MALDI-TOF i l'anàlisi de la seva activitat com a glicosiltransferases productores de glicolípid.

6.2 Obtenció de formes truncades de GT-MG517 a nivell d'ADN

Fins al moment GT-MG517 s'ha expressat en *E.coli* des del vector pET517HisC, en el qual el gen *mg517* es troba en el vector pET-44b(+) entre les dianes de restricció *Nde I* i *Avr II*. Aquesta disposició permet afegir a la proteïna una cua de 6 His al seu extrem C-terminal, tal com s'ha explicat en el Capítol 4.

Per tal d'obtenir les desitjades formes truncades de GT-MG517 es decideix canviar la posició de l'esmentada cua, ja que com que els talls en la seqüència es faran per l'extrem C-terminal, es creu més convenient treballar amb una cua a l'extrem N-terminal fixa per totes les formes truncades. Per aquest motiu es subclona *mg517* a un vector diferent, el qual permeti la desitjada cua d'His a l'extrem N-terminal de la proteïna.

6.2.1 Construcció del vector pET517HisN

El vector pET-15b(+) permet la introducció d'una cua de sis His a l'extrem N-terminal d'un gen que es trobi entre les dianes *Nde I* i *BamH I*. A més de l'esmentada cua, el disseny del *Multiple Cloning Site* implica l'addició d'alguns aminoàcids extres a la proteïna clonada entre les anteriors dianes, tal com es mostra a la Figura 6.7.

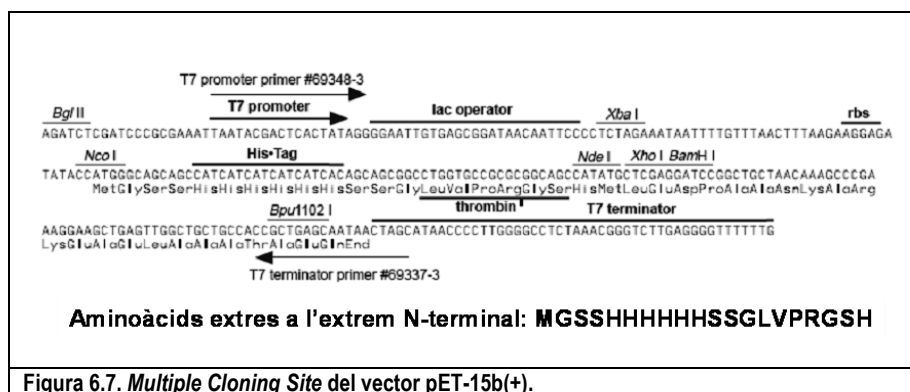


Figura 6.7. *Multiple Cloning Site* del vector pET-15b(+).

L'obtenció del gen *mg517* entre les dianes *Nde I* i *BamH I* té lloc a partir d'un vector construït anteriorment en el projecte anomenat p517wt [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007]. La seva digestió amb els corresponents enzims de restricció *Nde I* i *BamH I* genera el fragment que es lliga amb el vector pET-15b(+) digerit amb els mateixos enzims. El procediment es descriu en el punt 8.3.1 de la *Part Experimental*. La seqüència del vector resultant de la lligació, el qual s'anomena pET517HisN, es comprova mitjançant la seva seqüenciació i es presenta a l'Annex 2.

6.2.2 Expressió i purificació de GT-MG517 a partir del vector pET517HisN

Totes les proves d'expressió i purificació de GT-MG517 explicades en el Capítol 4 "Expressió i purificació de GT-MG517" s'han realitzat a partir del vector pET517HisC, el qual produeix la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* amb una cua d'His a l'extrem C-terminal. Per tant, els protocols optimitzats ho estan per aquesta proteïna i és necessari comprovar que són també vàlids per a l'expressió i purificació de GT-MG517 des del nou vector pET517HisN.

Per aquest motiu es transformen cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 amb aquest vector i el vector d'expressió de les xaperones, pGro7. Aquestes es fan créixer en un litre de medi LB i s'indueix l'expressió de GT-MG517 i les esmentades xaperones seguint el protocol estàndard (Protocol 9.1.4 de la *Part Experimental*). El *pellet* resultant del cultiu crescut es resuspèn en el tampó de solubilització de composició 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol i les cèl·lules es lisen mitjançant el seu pas per un disruptor cel·lular. L'extracte proteic que conté GT-MG517 solubilitzada es recupera per centrifugació i es carrega en una columna d'afinitat amb Ni^{2+} . El procediment que se segueix per a purificar GT-MG517 és l'establert com a estàndard al final del Capítol 4 i utilitzat per a l'obtenció de la proteïna de la qual se n'ha estudiat l'activitat en el Capítol 5. Així doncs, un cop immobilitzada a la columna, la proteïna se sotmet a un canvi de tampó que n'elimina el detergent. Amb aquest nou tampó de composició 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20 % glicerol, s'eliminen les impureses unides de forma inespecífica a la columna mitjançant un petit gradient d'imidazole i, a continuació, s'elueix GT-MG517 amb un graó d'aquest (Protocol 9.2 de la *Part Experimental*).

A la Figura 6.8 es presenta el resultat de la purificació. Si s'observa el perfil d'impureses que acompanyen GT-MG517HisN, es comprova que és pràcticament equivalent al que s'obté amb el mateix protocol però expressant GT-MG517HisC (veure Figura 4.25). Cal recordar que en aquest cas s'ha establert que es tracta de productes de degradació de la pròpia proteïna, fet que no s'ha comprovat en el cas de GT-MG517HisN.

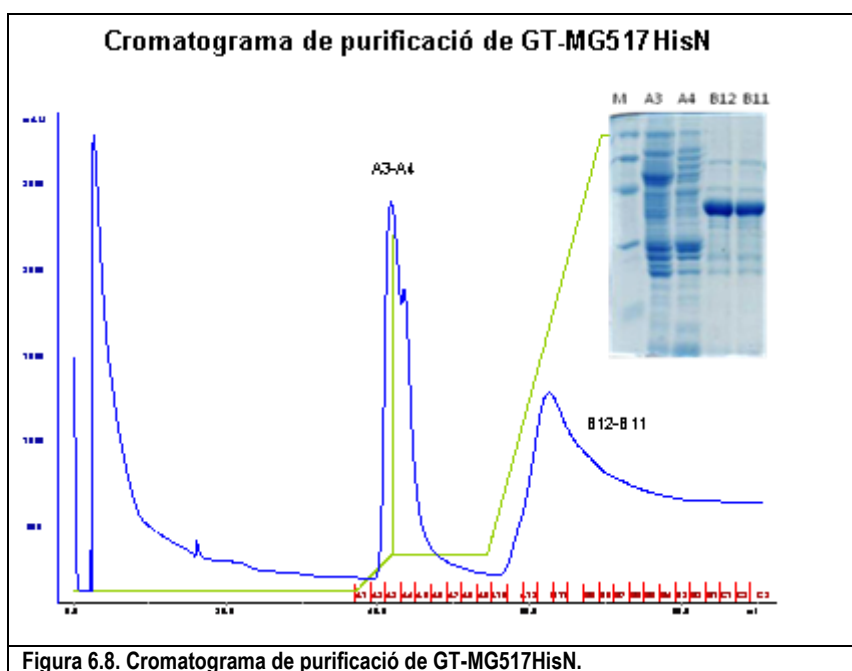
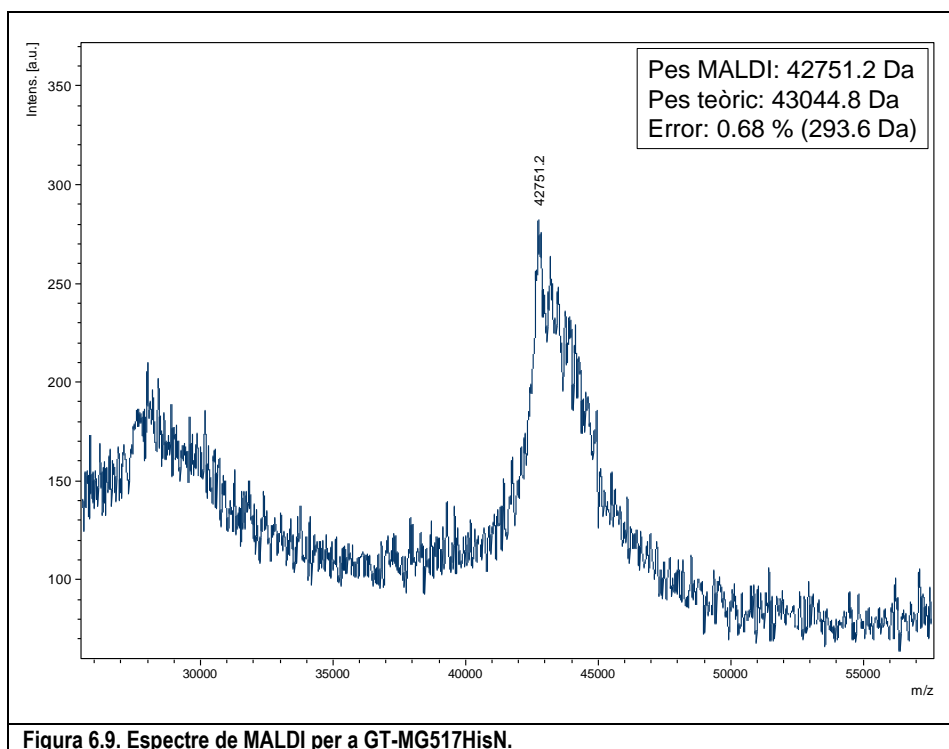


Figura 6.8. Cromatograma de purificació de GT-MG517HisN.

El que sí que s'ha comprovat mitjançant la tècnica de MALDI-TOF és el pes molecular de la proteïna purificada. En aquest cas no s'ha realitzat una digestió triptica des d'una banda d'un gel, sinó que s'ha analitzat l'enzim en solució. A la Figura 6.9 es mostra el perfil obtingut, el qual és molt irregular degut a l'elevat contingut en sals del tampó final en el qual es troba la proteïna (20 mM HEPES, 500 mM NaCl i 20 % glicerol). Si GT-MG517 purificada amb una cua d'His a l'extrem C-terminal té un pes molecular de 41946.6 Da, la mateixa proteïna però purificada amb la cua d'His a l'extrem N-terminal té un pes superior degut als aminoàcids extrems que el disseny del vector inclou a la seqüència, fet comentat a la Figura 6.7. Aquest pes molecular és de 43044.8 Da.



El resultat de l'espectre de MALDI presenta un 0.68 % d'error a l'hora d'adjudicar el pes molecular de GT-MG517HisN. Aquest fet pot tenir el seu origen en les sals presents en el tampó, les quals impedeixen una correcta detecció de la proteïna. D'altra banda, podria pensar-se en la pèrdua d'algun dels aminoàcids inicials de la seqüència proteica, per exemple metionina i glicina, els dos primers. Aquest processament donaria una proteïna amb 224 Da menys de l'esperat, un valor que tampoc coincideix amb la diferència establerta per MALDI.

Tot i la lleugera divergència de pes molecular entre el resultat del MALDI i la seqüència teòrica de GT-MG517HisN, es considera que la proteïna purificada mitjançant cromatografia d'afinitat és l'esperada GT-MG517 amb la cua d'His a l'extrem N-terminal i es creu que l'esmentada divergència té la seva explicació en la matriu salina on es troba la proteïna.

6.2.3 Producció de glicolípids per part de GT-MG517HisN

Finalment, abans de procedir a l'obtenció de les formes truncades de GT-MG517, cal comprovar que la proteïna amb la cua d'His a l'extrem N-terminal presenta la mateixa activitat que la que té la cua a l'altra extrem i amb la qual s'ha treballat fins al moment.

A tal efecte es realitzen tres experiments diferents. En el primer d'ells s'estudien els glicolípids que produeix GT-MG517HisN *in vivo*, és a dir, mentre es troba a les membranes d'*E.coli*. En el segon s'analitzen els productes generats *ex vivo* a partir d'extractes de cèl·lules d'*E.coli* que expressen la glicosiltransferasa, els quals actuen de font proteica en una reacció enzimàtica. Finalment, en el tercer experiment es calcula l'activitat específica *in vitro*, a partir d'un extracte proteic que conté GT-MG517 solubilitzada.

Per a l'activitat *in vivo* s'extreuen els glicolípids de les membranes de cèl·lules d'*E.coli* d'un cultiu on s'ha induït l'expressió de GT-MG517HisN (Protocol 10.1 de la *Part Experimental*). Per a l'activitat *ex vivo* s'empra un extracte de membranes de les mateixes cèl·lules d'*E.coli* com a font de GT-MG517HisN per a una reacció enzimàtica preparada segons el mètode d'anàlisi qualitatiu descrit en el Capítol 5 (Protocol 10.2 de la *Part Experimental*). Els resultats dels dos experiments descrits es recullen a la Figura 6.10.

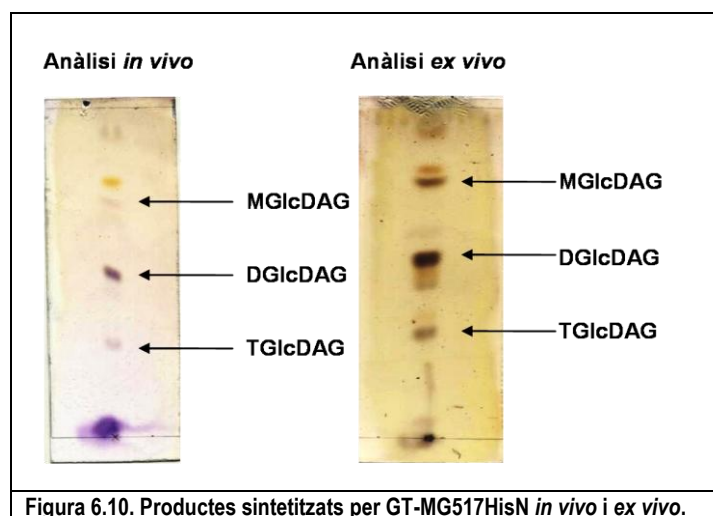


Figura 6.10. Productes sintetitzats per GT-MG517HisN *in vivo* i *ex vivo*.

Es comprova que en ambdós casos GT-MG517HisN és activa i produeix els glicolípids observats en els experiments equivalents realitzats amb GT-MG517HisC.

D'altra banda, la determinació de l'activitat específica de GT-MG517HisN en extracte es realitza a partir de l'assaig radiomètric descrit en el Capítol 5 del present treball. Un cultiu de cèl·lules d'*E.coli* cotransformades amb pET517HisN i pGro7 i induït segons el protocol 9.1.2 de la *Part Experimental* s'extreu amb el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 22 mM CHAPS, 10 % glicerol i l'extracte es recupera per centrifugació. Aquest és la font proteica per reaccions de condicions 20 mM HEPES pH 8, 20 mM MgCl₂, 20 mM CHAPS, 1.25 mM DOG, 12.5 mM DOPG, 1 mM UDP-¹⁴C-Glc i T = 35 °C, en les quals la concentració de proteïna total es varia entre 7 i 18 µg de proteïna total.

A la Taula 6.3 es presenta l'activitat específica en extracte de GT-MG517HisN i, per tal de comparar valors, la de GT-MG517HisC.

Taula 6.3. Activitat específica de la glicosiltransferasa en extracte.

Activitat específica (U/mg prot tot)	
HisN	HisC
0.047±0.004	0.036±0.004

Es comprova com els valors són en essència els mateixos, si es considera que en extracte per a GT-MG517HisC s'ha establert un interval d'activitat específica necessari perquè els diferents batch presentaven diferències significatives (0.036 – 0.052 U/mg de proteïna total).

En conclusió, la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* expressada amb una cua d'His a l'extrem N-terminal és equivalent a l'expressada amb la cua d'His a l'extrem C-terminal. Així doncs, és possible obtenir les formes truncades de la proteïna a partir del vector pET517HisN, per a continuació procedir a l'anàlisi de la seva expressió i activitat.

6.2.4 Estratègia de subclonació per a l'obtenció de les formes truncades de GT-MG517

La construcció de les set formes truncades de GT-MG517 a nivell d'ADN es realitza a partir de l'amplificació per PCR del gen *mg517* inserit entre les dianes *Nde I* i *BamH I* del vector pET-15b(+), és a dir, que el plasmidi pET517HisN constitueix el motlle del procés.

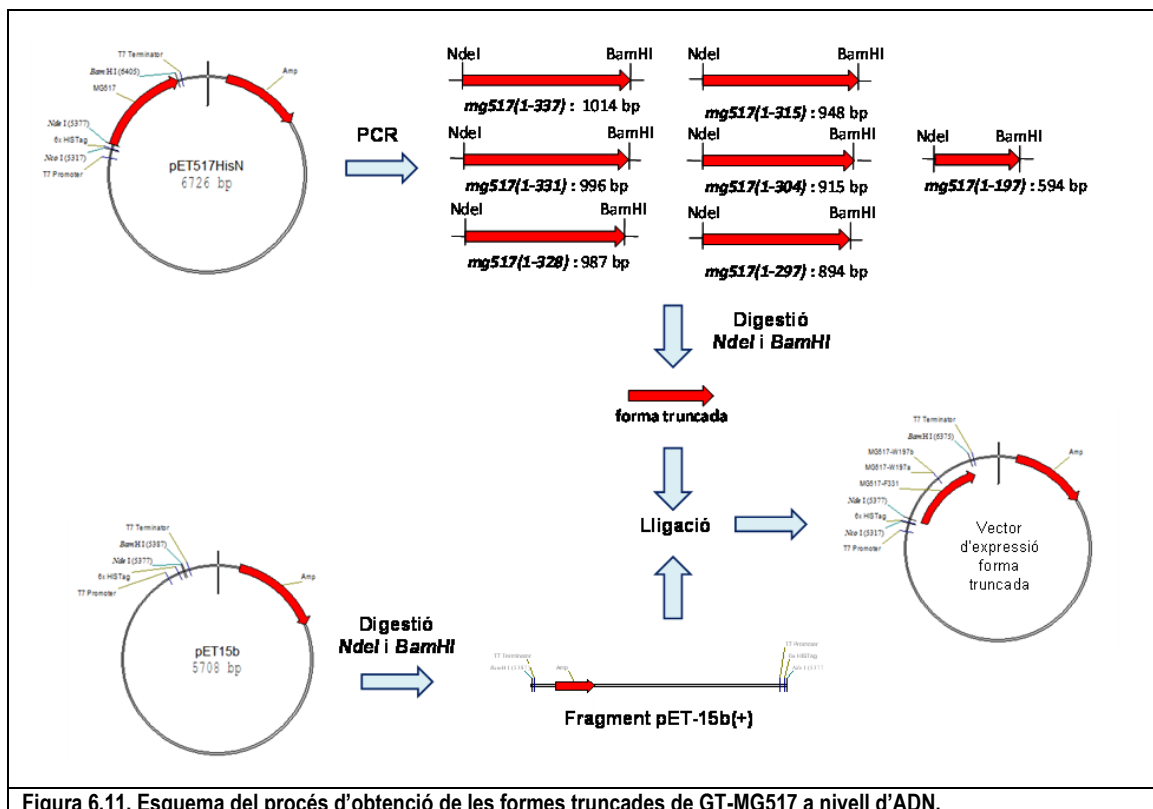


Figura 6.11. Esquema del procés d'obtenció de les formes truncades de GT-MG517 a nivell d'ADN.

Una vegada amplificat en cada cas el fragment corresponent a la forma truncada, aquest es digereix amb els enzims de restricció *Nde I* i *BamH I*, amb els quals també es digereix el vector pET-15b(+). La lligació d'ambdós fragments, és a dir, el de la forma truncada i el del vector, genera cadascun dels nous plasmidis que contenen les formes truncades a nivell d'ADN. A la Figura 6.11 es mostra un esquema del procediment.

6.2.4.1 Disseny dels encebadors

Per tal d'obtenir els diferents fragments del gen *mg517* que generen les diverses formes truncades de GT-MG517 s'utilitza la tècnica de PCR. Els encebadors necessaris per a l'amplificació de l'ADN s'aprofiten per a la incorporació a la seqüència que s'amplifica de les dianes dels enzims de restricció que serviran per a la seva posterior lligació a altres fragments d'ADN.

Les formes truncades de GT-MG517 s'obtenen a partir d'un únic encebador directe, el qual és complementari a la part inicial del gen *mg517* i incorpora la diana de l'enzim de restricció *Nde I*, i set encebadors reversos diferents, els quals són complementaris a la part final de la forma truncada corresponent i incorporen d'una banda, un codó de parada perquè en el moment de la transcripció la maquinària d'*E.coli* identifiqui el final del gen i de l'altra, la diana de l'enzim de restricció *BamH I*. A la Taula 6.4 es presenten les seqüències de tots els encebadors.

Taula 6.4. Encebadors dissenyats per a la construcció de les formes truncades de GT-MG517.

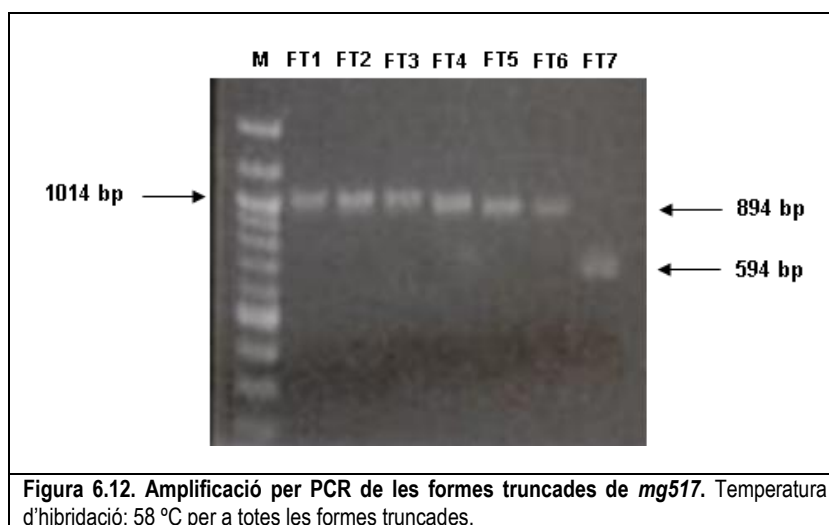
Encebador	Característiques			
	Longitud total (bp)	Longitud complementària (bp)	T _{fusió} (°C)	dG _{hib} (kcal/mol)
Directe per a totes les formes 5'-TGGGAATTC CATATGG GATAAACTTGTAGTATATT-3' <i>Nde I</i>	35	26	60.0	-54.3
Revers per a <i>mg517</i> (1-337) 5'-GTCGGGGATCC TTA AGATTCCAAAACATG-3' <i>BamH I</i>	29	15	64.2	-50.6
Revers per a <i>mg517</i> (1-331) 5'-GTCGGGGATCC TTA AAAAATATTTAGTCGCT-3' <i>BamH I</i>	31	17	62.6	-54.3
Revers per a <i>mg517</i> (1-328) 5'-GTCGGGGATCC TTA TAGTCGCTGTACCCAAA-3' <i>BamH I</i>	31	17	67.5	-55.8
Revers per a <i>mg517</i> (1-315) 5'-GTCGGGGATCC TTA TGTTTGAAAAACACGT-3' <i>BamH I</i>	30	16	65.3	-52.5
Revers per a <i>mg517</i> (1-304) 5'-GTCGGGGATCC TTA TTCCAAAAAACAATAG-3' <i>BamH I</i>	32	18	64.1	-55.8
Revers per a <i>mg517</i> (1-297) 5'-GTCGGGGATCC TTA TTCAAGAATTTTTTTTG-3' <i>BamH I</i>	31	17	63.5	-54
Revers per a <i>mg517</i> (1-197) 5'-GTCGGGGATCC TTA GATTGGTATATCTTCAA-3' <i>BamH I</i>	32	18	63.2	-53.3

Dins de les seqüències dels encebadors, les bases marcades en negreta constitueixen la zona complementària a la cadena motlle i les marcades en gris són el codó de parada. La temperatura de fusió és aquella que es té en compte

a l'hora d'establir la temperatura d'hibridació en la PCR i finalment, es presenta també l'energia d'hibridació de l'encebador amb l'ADN motlle. Cal dir que per tots els encebadors s'ha comprovat que l'energia de formació tant d'homodímers com d'heterodímers constitueix menys d'un 10 % de l'energia d'hibridació de l'encebador amb el seu motlle.

6.2.4.2 Obtenció de les formes truncades de *mg517* per PCR

La reacció de PCR que permet obtenir les formes truncades del gen *mg517* té lloc segons el protocol 8.3.2 de la *Part Experimental*. A la Figura 6.12 es presenta el gel d'agarosa on poden observar-se les amplificacions obtingudes en cada cas.



Pot observar-se com s'ha treballat per a totes les formes truncades amb la mateixa temperatura d'hibridació, 58 °C. Aquesta es troba 2 °C per sota de la $T_{\text{fusió}}$ de l'encebador directe, el qual posseeix la $T_{\text{fusió}}$ menor de tots els encebadors dissenyats i és, per tant, qui marca la $T_{\text{hibridació}}$. En el gel d'agarosa s'aprecia que s'ha produït amplificació per a totes les formes truncades, generant bandes de pesos moleculars que van d'entre 1014 bp per a la FT1 a 594 bp per a la FT7 (veure tots els pesos a la Figura 6.11). Tot i treballar amb un percentatge d'agarosa superior a l'1 % habitual (1.7 %), és difícil apreciar les diferències de pesos entre les bandes, ja que aquestes són molt petites.

Les formes truncades amplificades es recuperen del gel d'agarosa mitjançant la seva extracció i es digereixen amb els enzims de restricció *Nde I* i *BamH I* en una digestió doble segons les condicions descrites en el protocol 8.3.1 de la *Part Experimental*. Per recuperar els fragments digerits, es realitza una nova extracció de l'ADN d'un gel d'agarosa.

6.2.4.3 Construcció dels vectors finals d'expressió

Un cop es disposa de les formes truncades amplificades i digerides, cal obtenir el fragment del vector pET-15b(+) on seran lligades.

Inicialment, la digestió del vector s'ha realitzat a partir d'una digestió doble amb els enzims *Nde I* i *BamH I*. Ara bé, s'ha comprovat que l'esmentada digestió no és efectiva, ja que després de produir-se la reacció de lligació amb els fragments de les formes truncades i l'anàlisi dels transformants, aquests únicament contenen el vector pET-15b(+) relligat i el nombre d'insercions és nul.

L'explicació per aquest fet es troba en l'enorme proximitat existent entre les dues dianes de restricció en la seqüència del vector pET-15b(+). Si s'observa el seu MCS, presentat en la Figura 6.7, s'aprecia que únicament deu bases separen una diana de l'altra. Aquest fet causa que en una digestió doble, els enzims es molestin entre si i no puguin tallar correctament el vector.

Per tant, es procedeix a la digestió de pET-15b(+) mitjançant un protocol seqüencial, en el qual primer el vector es digereix amb *BamH I*, el fragment resultant es purifica a partir de la seva extracció d'un gel d'agarosa i se sotmet a una segona digestió, aquest cop amb *Nde I*. El fragment final es recupera també per extracció d'un gel (Protocol 8.3.3.1 de la *Part Experimental*).

Abans de realitzar la lligació entre el fragment del vector pET-15b(+) i les diferents formes truncades del gen *mg517* es realitza un control de relligació amb l'esmentat fragment, el qual dona un resultat negatiu, indicant que la digestió seqüencial talla de forma correcta el vector pET-15b(+).

Les condicions de la lligació del fragment del vector pET-15b(+) i les formes truncades del gen *mg517* es detallen en el protocol 8.3.3.2 de la *Part Experimental*. El resultat de la lligació s'utilitza per a la transformació de cèl·lules d'*E.coli* DH5 α competents i s'analitzen els transformants obtinguts per tal de comprovar la correcta inserció de les formes truncades. Aquest anàlisi té lloc a partir de l'aïllament de l'ADN plasmídic de cadascun dels transformants i l'ús d'aquest com a motlle en una reacció de PCR amb els encebadors universals T7, els quals hibriden respectivament al promotor T7 i al terminador T7 que tenen tots els vectors del tipus pET, com és el cas de pET-15b(+) (Protocol 8.3.3.3 de la *Part Experimental*).

A la Figura 6.13 es presenta, a tall d'exemple, un gel d'agarosa que permet la visualització de les bandes amplificades per PCR d'alguns transformants.

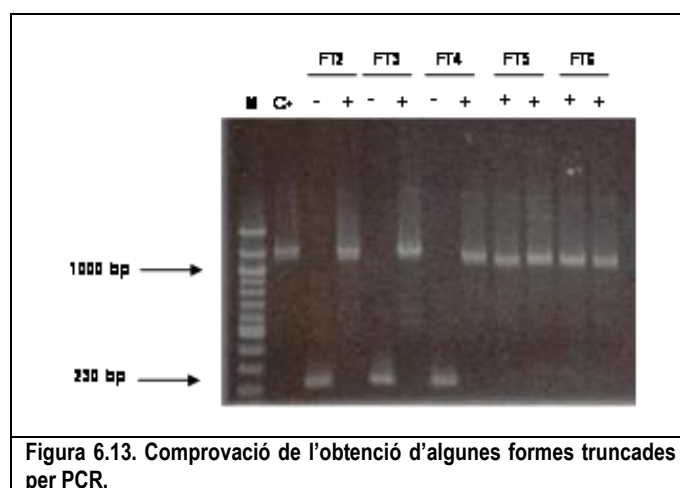


Figura 6.13. Comprovació de l'obtenció d'algunes formes truncades per PCR.

S'observa com quan es produeix la inserció correcta de la forma truncada, s'amplifica una banda de pes molecular variable segons la forma truncada però pròxim als 1200 bp; en canvi, quan només té lloc la religació del vector, els encebadors amplifiquen una banda molt petita de 230 bp aproximadament, corresponent a la zona existent entre el T7 promotor i el T7 terminador en el vector original pET-15b(+).

Finalment, per tal de confirmar de forma inequívoca la inserció correcta de les set formes truncades del gen *mg517* entre les dianes *Nde I* i *BamH I* del vector pET-15b(+), es seqüencien els plasmidis aïllats dels transformants que donen resultats positius en el control de PCR explicat anteriorment. Aquesta seqüenciació es presenta a l'Annex 2.

Això doncs, un cop confirmades les seqüències, es disposa ja de les formes truncades de GT-MG517 a nivell d'ADN i en un vector d'expressió, a punt per a estudiar-ne la seva expressió en *E.coli*, la seva purificació i la seva activitat.

6.3 Expressió i purificació de les set formes truncades de GT-MG517

L'expressió i purificació de les set formes truncades de GT-MG517 es realitza a partir de l'aplicació del mateix protocol desenvolupat per a GT-MG517HisC i comprovat com a vàlid també per a GT-MG517HisN.

Així doncs es co-transformen cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 amb el plasmidi pGro7 i el corresponent a la forma truncada desitjada en cada cas. Notar que es continua co-expressant la proteïna d'interès amb xaperones, ja que no se sap com afectarà a l'expressió l'eliminació de part de la seqüència d'aminoàcids i pot ser que la funció de les xaperones continuï sent requerida.

Les cèl·lules cotransformades es fan créixer en un litre de medi LB i s'indueix l'expressió de la glicosiltransferasa i de les xaperones segons el protocol 9.1.3 de la *Part Experimental*. El *pellet* cel·lular del cultiu induït es resuspèn en el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol i les cèl·lules es lisen mitjançant el seu pas per un disruptor cel·lular. L'extracte proteic solubilitzat es recupera per centrifugació i es carrega en una columna d'afinitat per Ni²⁺. A continuació, i mitjançant el pas d'un tampó de composició 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i 20 % glicerol, s'elimina el detergent CHAPS unit a la proteïna immobilitzada a la columna. L'elució d'aquesta té lloc posteriorment a partir de dos passos. En el primer s'eliminen les impureses unides de forma inespecífica a la columna a partir d'un petit gradient d'imidazole i en el segon s'elueix la forma truncada corresponent amb un graó d'imidazole (Protocol 9.2 de la *Part Experimental*).

A les Figures 6.14 i 6.15 es presenten els perfils de cadascuna de les cromatografies d'afinitat realitzades i els gels de SDS-PAGE que permeten analitzar les fraccions de proteïna obtingudes.

Tant per a la FT1 com per a la FT2, l'expressió de proteïna es dona en uns nivells equiparables a l'expressió de la glicosiltransferasa completa. El mateix pot dir-se del nivell d'impureses present a la mostra. Com es pot veure en els gels de SDS-PAGE d'ambdues purificacions, s'inclou un carril amb mostra d'aquesta forma completa per tal d'intentar visualitzar la diferència de pesos moleculars. No obstant, això és molt difícil, ja que en el cas de la FT1, el

nombre d'aminoàcids eliminats és de 3, valor que equival a una disminució en el pes molecular de 444.5 Da; i en el cas de la FT2, els aminoàcids eliminats són 10, els quals corresponen a 1138.3 Da.

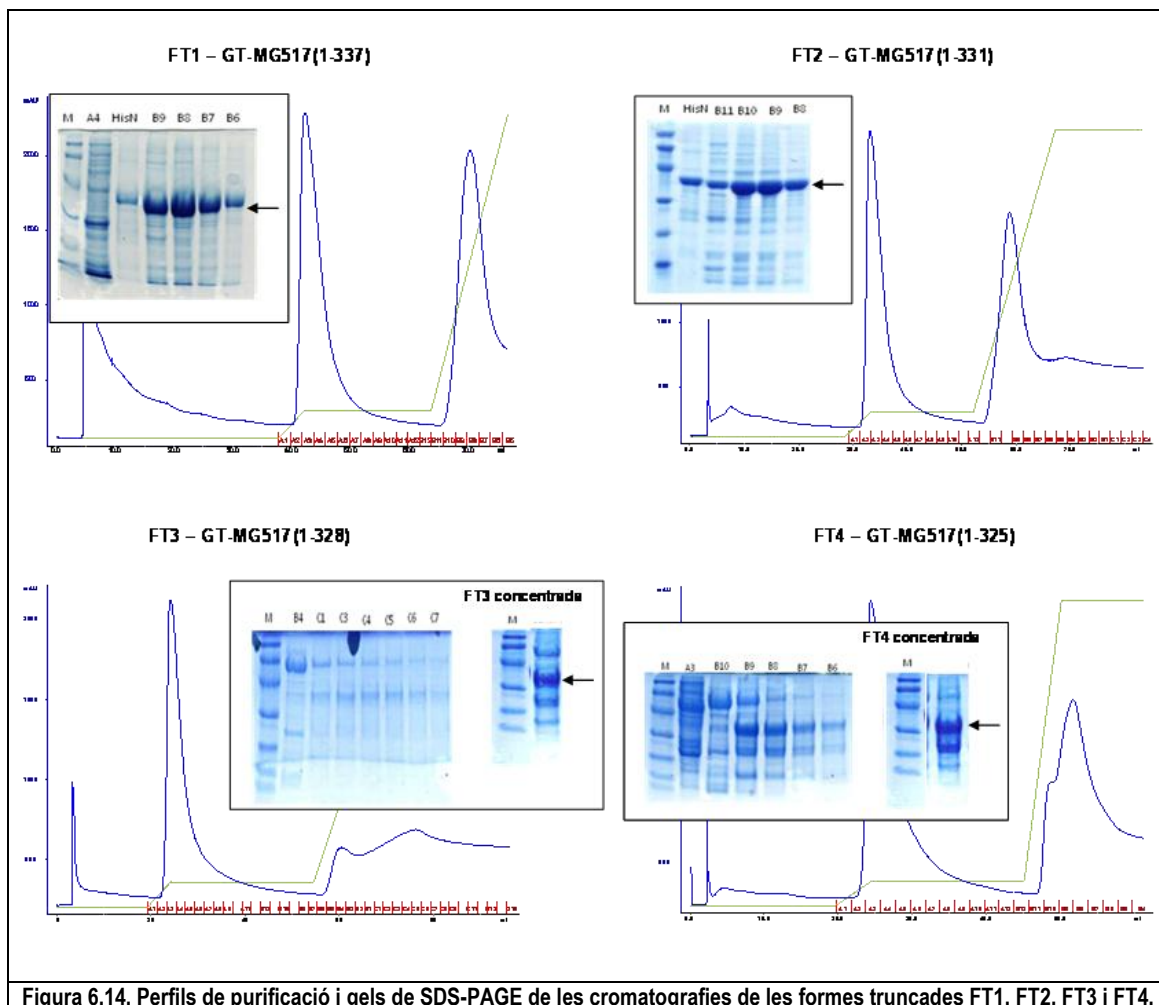


Figura 6.14. Perfils de purificació i gels de SDS-PAGE de les cromatografies de les formes truncades FT1, FT2, FT3 i FT4.

En el cas de la FT3, l'expressió proteica és molt pobre. Tot i això, les diferents fraccions obtingudes es concentren per tal d'intentar determinar la presència de GT-MG517(1-328). Tal com s'observa en el segon gel de SDS-PAGE, la forma truncada s'expressa de forma soluble, però al mateix nivell de concentració que les impureses que també estan presents a les mostres i que en altres purificacions constitueixen components minoritaris.

Amb la FT4 ocorre quelcom semblant, tot i que en aquest cas la quantitat de forma truncada present en solució és més important. No obstant, la intensitat de les bandes d'impureses és del mateix nivell que la de la banda corresponent a la forma truncada.

La purificació de la FT5 és la que genera una quantitat inferior de proteïna. Es considera que la banda que es marca en el gel de SDS-PAGE és GT-MG517(1-304), però per confirmar-ho, s'extreu i se sotmet a una digestió trípica, els fragments de la qual s'analitzen per MALDI-TOF, tal com es descriu més endavant.

El nivell d'expressió de la FT6 es troba en un punt intermedi entre aquelles formes que s'expressen molt bé i aquelles que presenten una expressió molt baixa. Si s'observa el primer dels gels de SDS-PAGE, s'aprecia que la

intensitat de la banda de GT-MG517(1-297) no és molt important. Tanmateix, quan es concentren algunes de les fraccions del primer gel, la banda de la forma truncada té una intensitat molt superior a la de les impureses que l'acompanyen. En el gel on es visualitza aquesta concentració s'ha carregat també la forma completa de GT-MG517. En aquest cas sí que és possible apreciar la diferència entre les dues proteïnes, ja que la diferència de pesos moleculars és de 5439.3 Da.

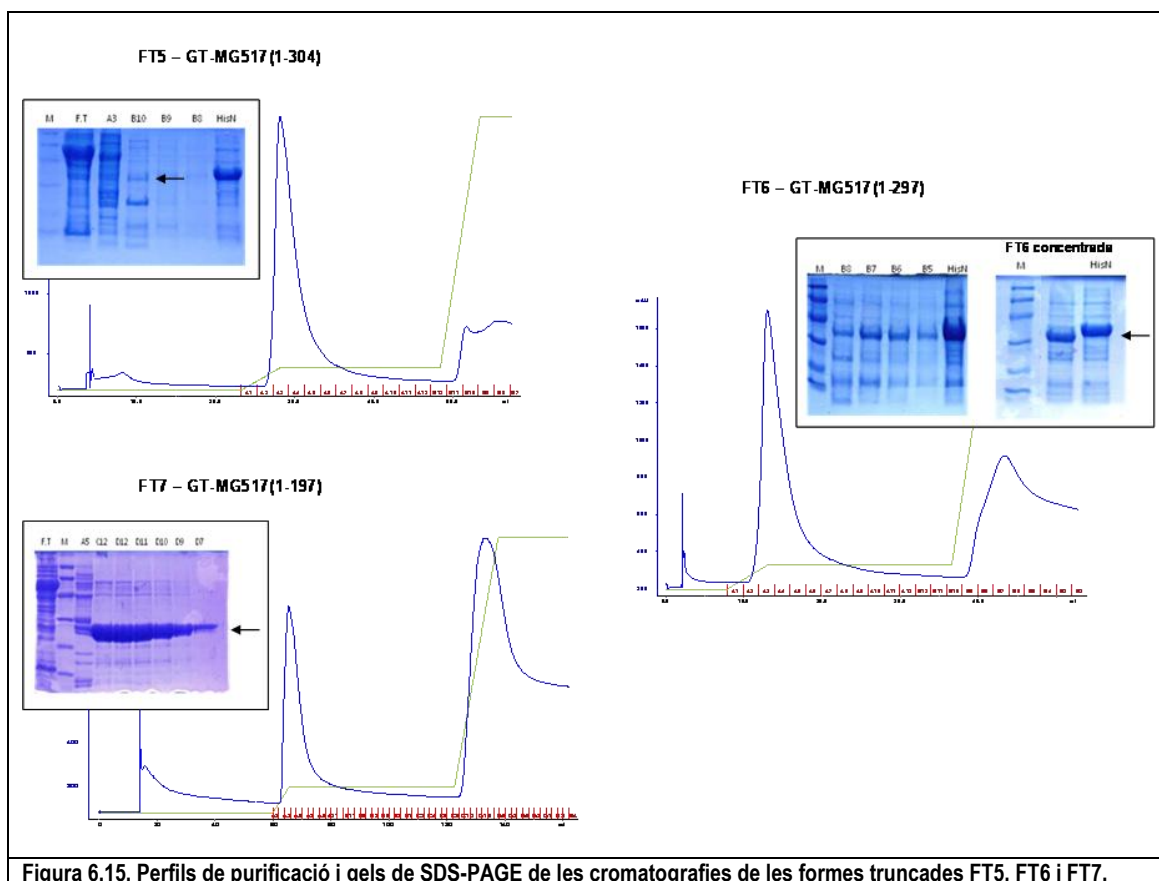


Figura 6.15. Perfils de purificació i gels de SDS-PAGE de les cromatografies de les formes truncades FT5, FT6 i FT7.

Finalment, la FT7, corresponent al teòric domini d'unió de la proteïna, és la forma truncada que presenta una millor expressió. Aquest fet podria explicar-se perquè se li ha eliminat completament la zona d'interacció amb la membrana i s'ha convertit en una proteïna soluble. Ara bé, aquest comportament no era previsible a priori, ja que es tracta d'una forma truncada on s'han eliminat 144 aminoàcids, fet que podria desestabilitzar per complet l'estructura proteica i fer que la seva expressió com a forma soluble fos nul·la.

6.3.1 Anàlisi per MALDI-TOF del pes molecular de les formes truncades de GT-MG517

La visualització en un gel de SDS-PAGE de les diferents formes truncades purificades per cromatografia d'afinitat no és suficient per a confirmar-ne la identitat, ja que si bé en alguns casos el gel permet observar les diferències de pes molecular existents respecte la forma completa de la glicosiltransferasa, en altres aquesta diferència és tan petita que resulta inapreciable.

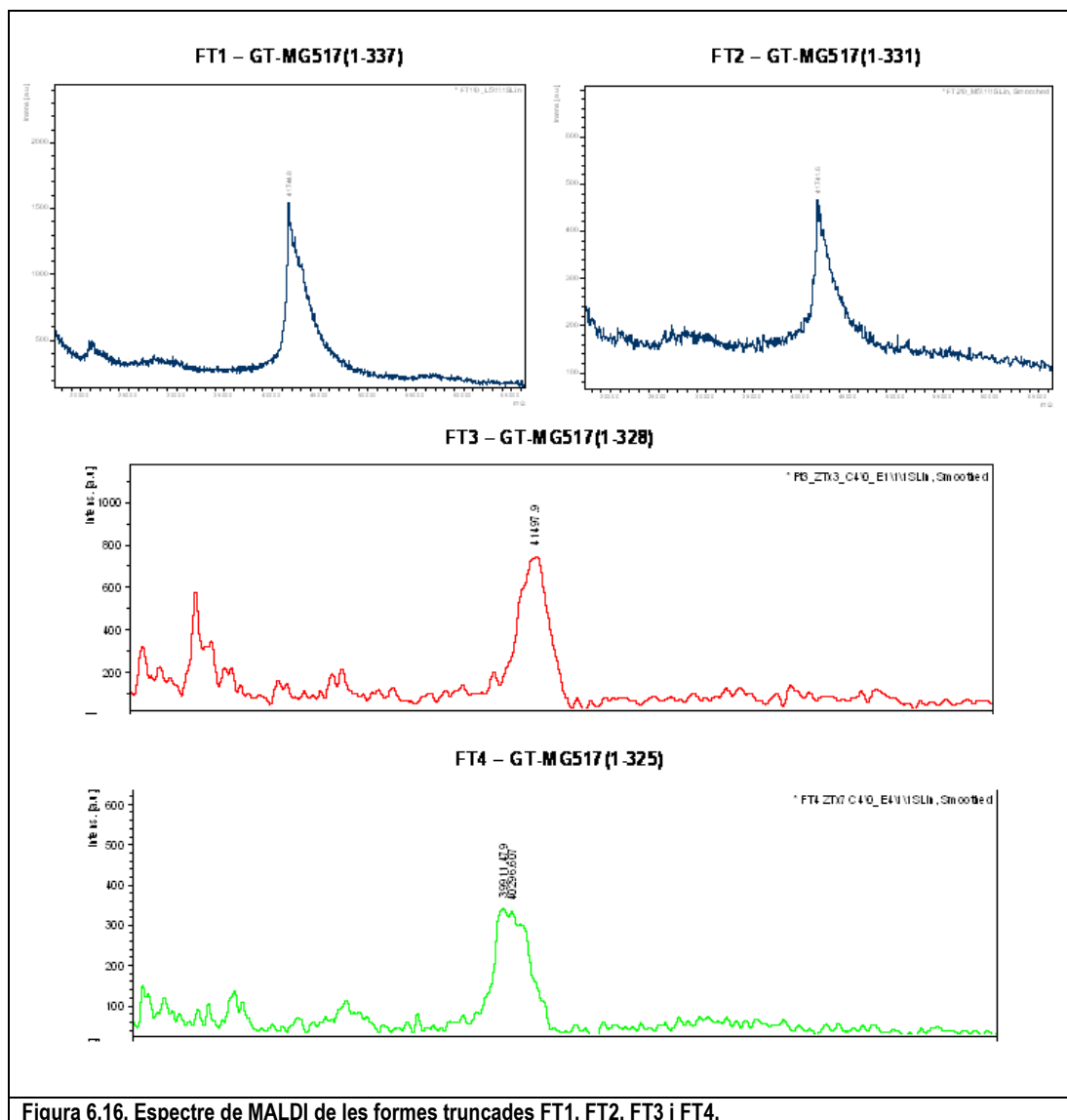


Figura 6.16. Espectre de MALDI de les formes truncades FT1, FT2, FT3 i FT4.

La manera de confirmar la identitat de cada forma truncada és el seu anàlisi mitjançant la tècnica de MALDI-TOF. Així doncs, les mostres obtingudes directament després del procés de purificació, o en algunes formes truncades, el resultat del procés de concentració amb centricon, s'utilitzen amb l'esmentat objectiu. Notar que totes les proteïnes es troben en el tampó d'elució de la columna d'afinitat, ja que no se sotmeten a diàlisi. Per tant, una gran quantitat de sal i imidazole les acompanyen. Aquesta és l'explicació per a l'obtenció d'uns espectres amb un elevat soroll de fons, especialment per aquelles mostres on la quantitat de proteïna és menor.

A la Taula 6.5 es recullen els pesos moleculars teòrics de totes les formes truncades i els que s'obtenen a partir del MALDI, amb el corresponent percentatge d'error. Aquest en alguns casos és elevat, però s'explica pel ja comentat elevat contingut en sals de les mostres. Els espectres de MALDI enregistrats es presenten a les Figures 6.16 i 6.17.

Taula 6.5. Pesos moleculars teòrics i reals de les formes truncades de GT-MG517.

Forma truncada	PM teòric (Da)	PM real (Da)	Error (%)
FT1 - GT-MG517(1-337)	42600.3	41744.8	2
FT2 - GT-MG517(1-331)	41906.5	41741.6	0.39
FT3 - GT-MG517(1-328)	41468	41497.9	0.07
FT4 - GT-MG517(1-315)	39805	39911.5	0.26
FT5 - GT-MG517(1-304)	39482.5	-	-
FT6 - GT-MG517(1-297)	37605.5	37939.1	0.88
FT7 - GT-MG517(1-197)	25547.5	25468.4	0.31

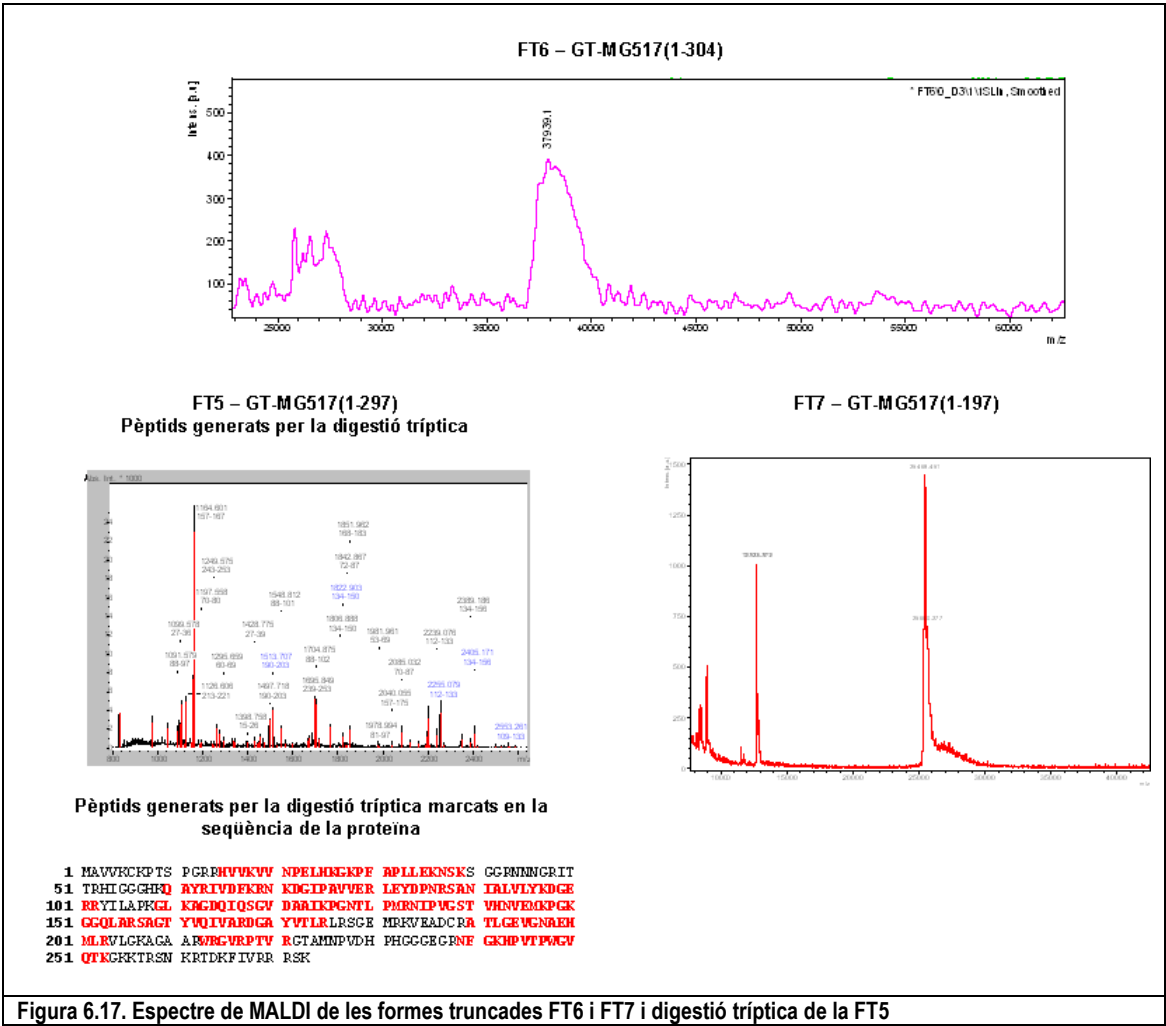


Figura 6.17. Espectre de MALDI de les formes truncades FT6 i FT7 i digestió tròptica de la FT5

Tots ells confirmen l'obtenció de les corresponents formes truncades dissenyades per a GT-MG517. En el cas de la FT5, proteïna que s'ha analitzat mitjançant una digestió tròptica, el resultat d'aquesta es presenta també a la Figura 6.17. Els diferents fragments que s'identifiquen corresponen a la seqüència de la forma truncada, fet que corrobora que la banda estreta del gel de SDS-PAGE és la de GT-MG517(1-304).

Per tant, es conclou que totes les formes truncades s'expressen en *E.coli* a partir dels plasmidis obtinguts segons s'ha explicat en l'apartat anterior, de tal manera que és possible solubilitzar-les amb el tampó 20 mM HEPES pH 8,

500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol. Un cop solubilitzades, totes elles poden ser purificades en major o menor mesura mitjançant cromatografia d'afinitat i la seva identitat ser confirmada per MALDI-TOF o digestió triptica.

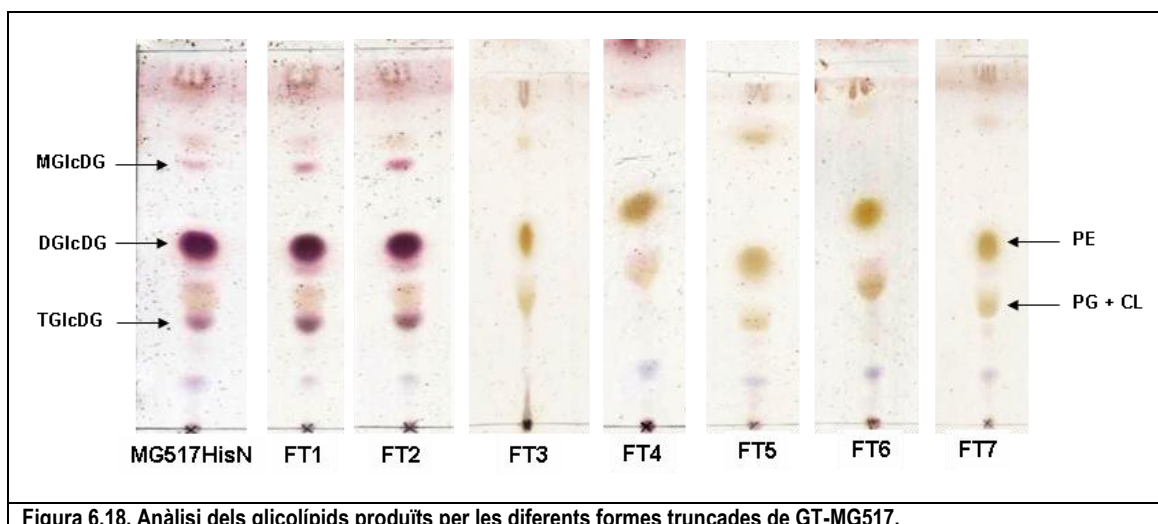
El següent pas, doncs, és l'anàlisi de l'activitat de cadascuna d'elles, informació que permetrà establir una relació entre la longitud de la proteïna i la seva funcionalitat.

6.4 Anàlisi de l'activitat *in vivo* de les formes truncades de GT-MG517

Per tal d'establir si les formes truncades de GT-MG517 dissenyades amb l'objectiu d'estudiar la influència de l'extrem C-terminal de la proteïna en l'activitat són funcionals, es decideix analitzar si són capaces d'induir la producció de glicolípid en les cèl·lules d'*E.coli* que les expressen.

A tal efecte, s'analitza el contingut en glicolípid d'una mostra de cèl·lules d'*E.coli* dels mateixos cultius que s'han emprat per a la purificació de les formes truncades. D'aquesta manera s'assegura la presència de cadascuna de les proteïnes en una forma solubilitzable pel tampó d'extracció, ja sigui amb més o menys quantitat, com s'ha comprovat en les diferents purificacions. Amb aquest procediment se suposa que si la proteïna es pot solubilitzar, es troba correctament plegada i pot ser funcional, en cas que l'eliminació dels aminoàcids que l'ha generat no hagi afectat la seva activitat.

L'anàlisi dels glicolípid té lloc segons el protocol 10.1 de la *Part Experimental*, a partir de la seva extracció de les cèl·lules d'*E.coli* provinents de 10 mL de cultiu induït. El resultat per a cadascuna de les formes truncades es presenta a la Figura 6.18.



S'observa com únicament són actives, a més de la forma completa de la proteïna, les formes truncades GT-MG517(1-337) i GT-MG517(1-331), és a dir, FT1 i FT2. La resta de proteïnes han perdut la capacitat de síntesi de glicolípid i en les corresponents capes fines només es distingeixen els lípids propis d'*E.coli* que s'extreuen en el procés i que són PE (fosfatidiletanolamina) i una mescla de PG (fosfatidilglicerol) i CL (cardiolipina).

Així doncs, es conclou que els 10 últims aminoàcids de GT-MG517 no influeixen en l'activitat de la proteïna, com a mínim en l'aspecte qualitatiu que permet establir l'anàlisi de glicolípid anterior. Cal dir que no s'han realitzat mesures quantitatives de l'activitat de les formes truncades FT1 i FT2, però que si s'observa la intensitat de les taques de MGlcDG i DGlcDG presents en les respectives mostres, no presenten diferències respecte la dels glicolípid de la proteïna completa. És a dir, que l'eliminació dels esmentats 10 aminoàcids no altera la relació MGlcDG/DGlcDG en els productes que sintetitzen les formes truncades, fet que permet hipotetitzar que aquests residus no són necessaris per tal que la glicosiltransferasa porti a terme la seva funció.

Pel que fa a les altres formes truncades, el fet que hagi estat possible la seva purificació d'un extracte soluble, implica que teòricament es troben ben plegades quan es troben a la membrana d'*E.coli* i que, per tant, si no presenten activitat és perquè els aminoàcids eliminats en les seves seqüències resulten essencials per a la seva funció. Tanmateix, caldria comprovar la hipòtesi del plegament de les formes truncades purificades, mitjançant, per exemple, la realització de perfils de desnaturalització amb urea o l'enregistrament dels espectres de dicroïsm circular de cadascuna de les formes.

6.5 FT7-MG517(1-197): hipotètic domini catalític de GT-MG517

La preparació de la forma truncada GT-MG517(1-197) s'allunya una mica de l'objectiu de les altres formes truncades dissenyades, que és l'estudi del paper de l'extrem C-terminal de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* en la seva activitat i interacció amb la membrana.

En el cas de FT7, la proteïna s'ha tallat de tal manera que únicament s'ha conservat la seqüència del domini d'unió a nucleòtid descrit amb l'eina bioinformàtica Pfam (Figura 6.2), el qual es considera el centre catalític de l'enzim. La proteïna resultant del tall és una estructura sense cap element que li permeti associar-se a la membrana plasmàtica, ja que se li han eliminat les hèlix α de l'extrem C-terminal riques en Lys i possiblement amfipàtiques. Així doncs, no és sorprenent que pugui obtenir-se en una forma soluble. Tanmateix, el protocol utilitzat per a la seva purificació presenta elements necessaris per a proteïnes que sí que interaccionen amb la membrana, com són les xaperones i el detergent i glicerol del tampó, elements que potser no són realment requerits per la forma truncada.

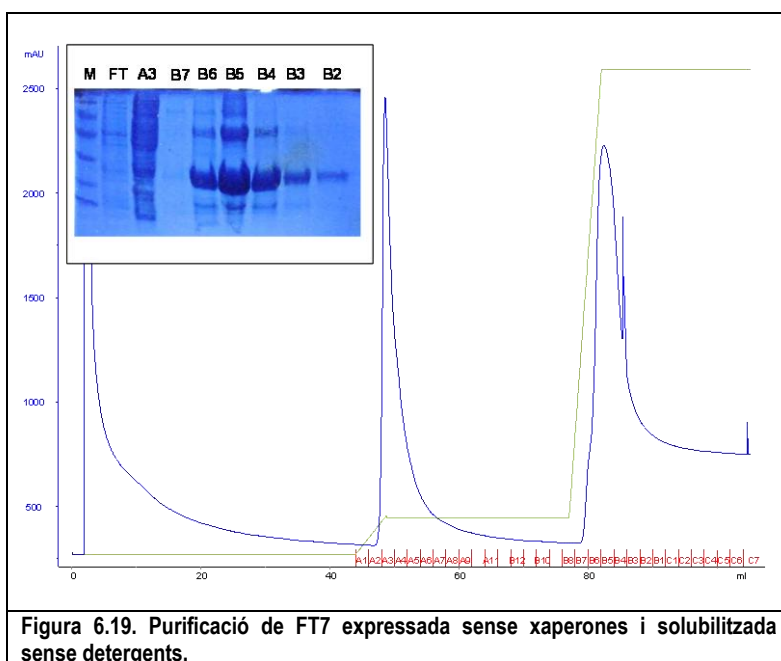
D'altra banda, l'interès que presenta FT7 és evident, ja que es tracta de l'hipotètic domini d'unió de GT-MG517 per al seu substrat donador. Es desconeix si la manca d'activitat enzimàtica és deguda a un plegament erroni o si el tall d'una part de la seqüència ha deixat a la proteïna sense el domini d'unió del seu substrat acceptor i, per tant, no es pot donar la reacció de síntesi de glicolípid. També hi hauria la possibilitat que la unió amb la membrana a través de l'extrem C-terminal provoqués un canvi conformacional en el domini catalític que el convertís en actiu. En aquest cas, FT7 hauria perdut l'esmentada possibilitat d'interacció i, en conseqüència, la capacitat de sintetitzar glicolípid.

No obstant la manca de funcionalitat de FT7, la seva cristal·lització aportaria informació sobre com s'acomoda el substrat donador de GT-MG517 en el domini catalític i quins són els residus clau per a l'activitat enzimàtica. Per tant,

es considera interessant aprofundir una mica més en el seu procediment de purificació, amb l'objectiu d'obtenir proteïna en unes quantitats i d'una puresa que permetin plantejar-se la seva cristallització.

Com ja s'ha comentat, l'absència en FT7 de la hipotètica zona d'interacció amb la membrana porta a pensar que les xaperones no són necessàries per a la seva expressió i que la seva solubilització no requereix cap detergent ni tampoc glicerol. Per tal de comprovar si aquesta hipòtesi és certa, es procedeix a l'expressió de la proteïna a partir de cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 únicament transformades amb el plasmidi corresponent a la forma truncada, és a dir, pET517HisN(1-197). Aquestes cèl·lules es fan créixer en un litre de medi LB i l'expressió i extracció de la glicosiltransferasa es realitza segons el protocol descrit en el punt 9.1.5 de la *Part Experimental*. El tampó d'extracció no conté detergent ni glicerol. La seva composició és 20 mM HEPES pH 8 i 500 mM NaCl. El protocol de purificació es manté com en les altres formes truncades. Per tant, primer es realitza un gradient d'imidazole curt, el qual elimina impureses unides inespecíficament a la columna, per a continuació procedir a eluir la forma truncada amb un graó d'imidazole (Protocol 9.2 de la *Part Experimental*).

A la Figura 6.19 es presenta el cromatograma resultant de l'esmentada cromatografia. S'observa com el procés de purificació de FT7 aconsegueix aïllar una gran quantitat de proteïna, si bé aquesta presenta dues impureses que l'acompanyen, de les quals la de pes molecular superior és molt important.



hidrofòbiques entre l'extrem C-terminal de diverses unitats de proteïna, les quals s'organitzen d'aquesta manera per tal d'aconseguir un grau d'estabilitat major. En el cas de FT7, l'eliminació de l'esmentat extrem C-terminal fa impossible l'establiment de les interaccions anteriors. Per tant, s'espera que la cromatografia de gel-filtració funcioni en aquest cas.

La columna que s'utilitza és la ja utilitzada en altres ocasions al llarg del treball, una XK 16 Superdex™ 200 de GE Healthcare empaquetada en el laboratori. El tampó d'elució de la cromatografia és el mateix en el qual es troba FT7 després de la columna d'afinitat, però sense imidazole; és a dir, 20 mM HEPES pH 8 i 500 mM NaCl. La mostra es carrega sense haver-la sotmès a un procés de diàlisi i per tant, conté una gran concentració d'imidazole. Es procedeix d'aquesta manera perquè l'eliminació de l'imidazole provoca la precipitació de la forma truncada, encara que aquesta es faci de forma progressiva al llarg de la diàlisi. Segurament la disminució de la força iònica del medi és la causa per la qual la proteïna es desestabilitza i precipita, fet que posa de manifest que l'estabilitat de FT7 no és comparable a la de la proteïna completa, com, d'altra banda, és esperable degut a la gran quantitat d'aminoàcids que se li han eliminat.

A la Figura 6.20 es presenta el resultat de la cromatografia de gel-filtració, la qual s'ha eluït amb un flux de 0.2 mL/min.

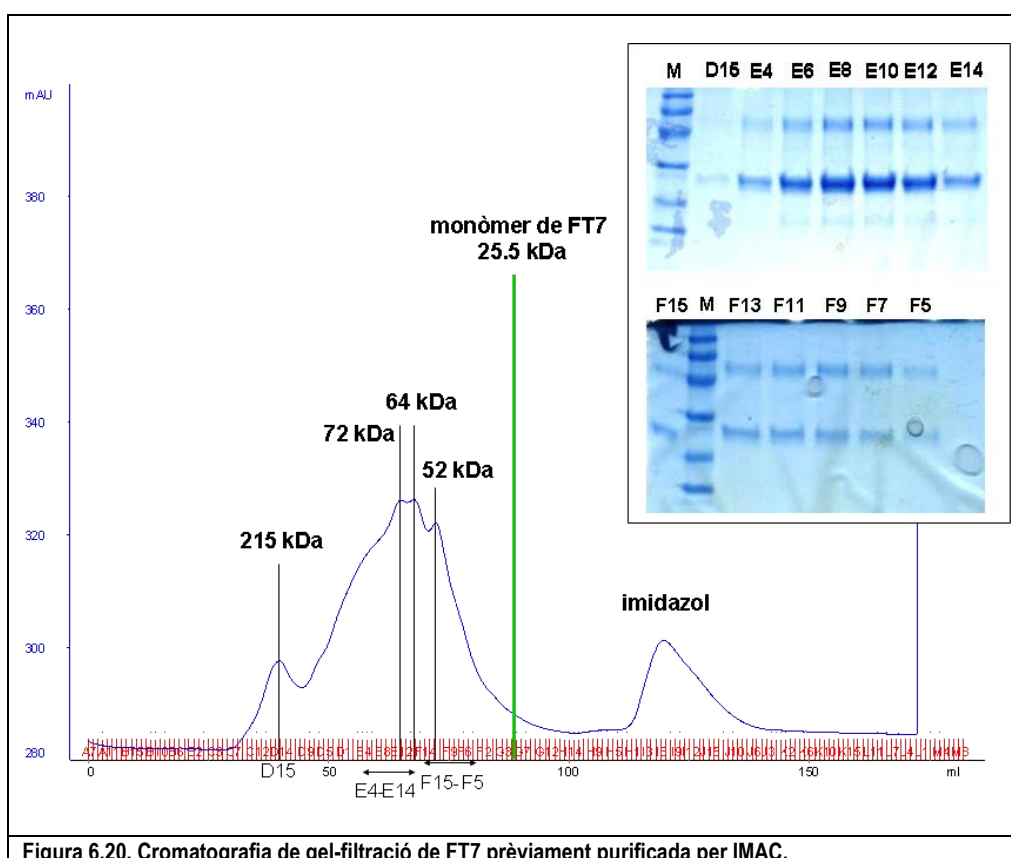
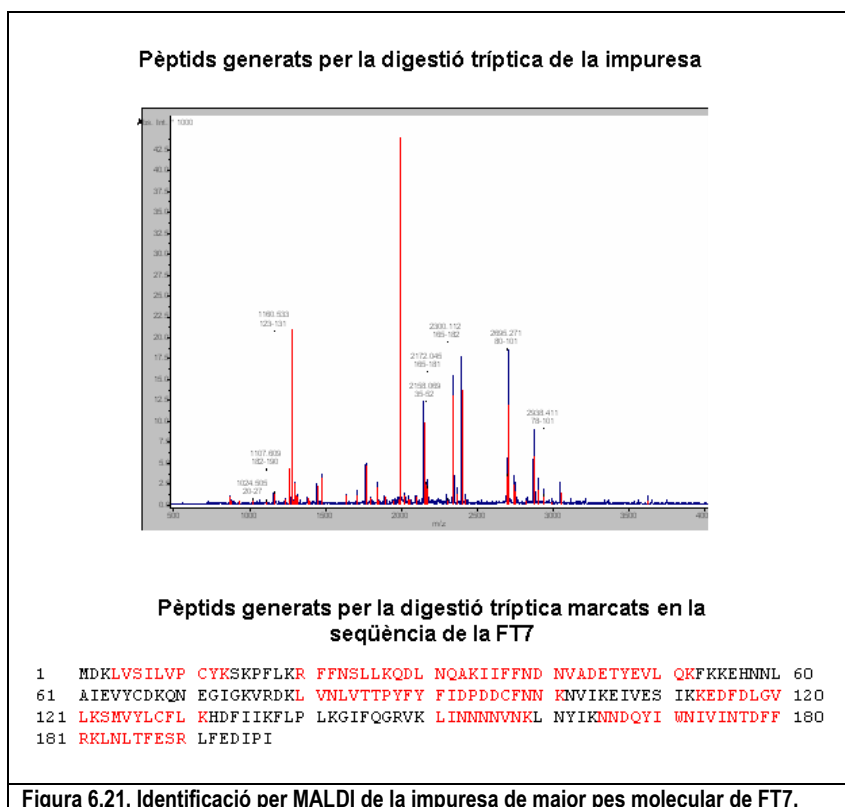


Figura 6.20. Cromatografia de gel-filtració de FT7 prèviament purificada per IMAC.

Com es pot veure en el perfil cromatogràfic i en els gels de SDS-PAGE que l'acompanyen, la columna de gel-filtració no és capaç de separar FT7 de les impureses que l'acompanyen. De fet, el contingut de les fraccions analitzades posa de manifest que els diferents pics que s'aprecien tenen composicions equivalents, si bé, segons la calibració

de la columna realitzada amb proteïnes de pes molecular conegut eluïdes en el mateix tampó que la mostra, els seus pesos moleculars són diferents. Sembla, doncs, que FT7 forma agregats en solució, de la mateixa manera que ho fa la proteïna completa. Per tant, la hipòtesi de la formació d'aquests agregats a partir de l'extrem C-terminal hidròfob de l'enzim perd força davant de l'esmentat resultat. Si bé no pot descartar-se que en la proteïna completa al menys una part dels agregats tinguin aquesta naturalesa, en la forma truncada aquesta associació és impossible.

L'estudi de la impuresa majoritària de la mostra de FT7 aporta, però, informació important per tal de determinar la naturalesa dels agregats que s'observen a partir de la cromatografia de gel-filtració. La seva digestió triptica i anàlisi dels corresponents pèptids per MALDI-TOF (veure Figura 6.20) permeten observar com l'esmentada impuresa és exactament la pròpia forma truncada, ja que tots els pèptids que es detecten corresponen a la seva seqüència. De fet, si es calcula el pes molecular de la impuresa en el gel de SDS-PAGE de la Figura 6.19 s'obté un valor de 50 kDa, el qual correspon al pes d'un hipotètic dímer de la forma truncada, que recordar posseeix un pes molecular de 25.5 kDa. Pel que fa a la impuresa de pes molecular més baix que FT7 (PM calculat de 9 kDa), podria tractar-se d'un producte de degradació de la forma truncada, tal com s'ha observat que ocorre en les mostres de GT-MG517HisC solubilitzades amb CHAPS. Tanmateix caldria confirmar aquesta hipòtesi realitzant la seva digestió triptica i identificant els pèptids resultants per MALDI.



Amb la identificació de la impuresa majoritària de FT7 com un dímer de la forma truncada, es poden explicar els agregats solubles que es distingeixen en la cromatografia de gel-filtració. Segons els pesos moleculars calculats i mostrats en la Figura 6.20, el dímer que apareix en el gel de SDS-PAGE correspondria al menor agregat que forma FT7 (52 kDa), ja que tots els altres pics tenen pesos moleculars que impliquen graus d'associació superiors, els quals poden incloure també la segona impuresa de la forma truncada. Tanmateix, el fet que el dímer pugui distingir-

se en un gel de SDS-PAGE implica que és altament estable, ja que les condicions desnaturalitzants del gel no són suficients per destruir-lo.

La manera com FT7 és capaç de generar un dímer i altres agregats es desconeix. La seqüència de la proteïna conté un nombre parell de Cys, quatre en concret. Alguna d'elles podria ser la responsable de la formació del dímer a través de l'establiment d'un pont disulfur amb una segona molècula de proteïna. També altres interaccions de caràcter electrostàtic podrien mantenir agregats solubles de FT7, iguals com la proteïna completa és capaç de formar.

El fet que l'eliminació de l'extrem C-terminal de la seqüència de GT-MG517 no disminueixi la seva tendència a agregar-se implica que no és aquesta part de la proteïna la responsable de l'agregació, tal com es podria pensar degut a l'elevat nombre de Lys presents en ella i en l'estructura predominant d'hèlix α . És possible que les hipòtesis realitzades per a GT-MG517 no siguin vàlides, com sembla que apunten les evidències experimentals. La modelització de l'estructura proteica de GT-MG517 podria donar molta informació sobre com la proteïna forma els agregats detectats i si la seva formació es troba relacionada amb la interacció de la proteïna amb la membrana. També aportaria llum a la localització dels dominis d'unió tant del substrat donador com de l'acceptor en el si de la seqüència.

6.6 Conclusions

Davant la possibilitat que l'activitat de GT-MG517 estigui condicionada per la seva interacció amb la membrana, tal com ocorre en les glicosiltransferases que sintetitzen glicolípids en altres micoplasmes com *Acholeplasma laidlawii*, s'ha decidit estudiar l'esmentada interacció, que en el cas de GT-MG517 es pensa té lloc mitjançant la part C-terminal de la seqüència de la proteïna.

Tot i l'estudi de la cadena polipeptídica de la glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium* a partir de diverses eines bioinformàtiques, no es pot establir una hipòtesi forta dels punts a través dels quals l'enzim entra en contacte amb la bicapa lipídica. Donat que les hèlix amfipàtiques del seu extrem C-terminal són molt riques en Lys i aquests residus, degut al seu caràcter bàsic es descriuen com a possibles zones d'interacció amb lípids aniónics de membrana, es decideix tallar la seqüència per aquests punts i així poder observar com l'eliminació d'un hipotètic punt d'ancoratge afecta l'activitat enzimàtica.

Així doncs, es dissenyen set formes truncades diferents de GT-MG517, sis obtingudes a partir del tall de la seqüència per una Lys de l'extrem C-terminal i una on només es conserva el teòric domini catalític de l'enzim.

Cadascuna de les formes truncades s'insereix en un vector d'expressió que inclou una cua d'His a l'extrem N-terminal de la proteïna. La seva expressió té lloc a partir del protocol establert per a la proteïna completa. Per tant, inclou la coexpressió amb xaperones i l'extracció de la membrana d'*E.coli* amb un tampó amb detergent i glicerol. L'aïllament de les formes truncades té lloc mitjançant cromatografia d'afinitat. Si bé els nivells d'expressió són

variables segons la forma, per a totes elles s'aconsegueix l'obtenció de proteïna soluble. Aquesta característica permet inferir que totes les formes es troben plegades de forma correcta quan són expressades en *E.coli* i, per tant, l'anàlisi dels glicolípid presents en el bacteri que les expressa és un reflex directe de l'activitat de cadascuna d'elles.

D'aquesta manera s'estableix que els deu últims aminoàcids de GT-MG517 són prescindibles per a la seva activitat, ja que les formes truncades corresponents continuen tenint la capacitat de sintetitzar glicolípid. No obstant, l'eliminació d'un nombre superior de residus, inactiva la proteïna, ja sigui perquè aquesta perd el domini d'unió del substrat acceptor o la possibilitat d'unir-se a la membrana i ser activada per aquesta.

La forma truncada corresponent al domini catalític de GT-MG517 presenta uns nivells molt elevats d'expressió amb el protocol que inclou xaperones i l'extracció amb detergent i glicerol, nivells que es conserven quan ambdós elements s'eliminen. Aquest fet implica que l'eliminació de les hèlix amfipàtiques de l'extrem C-terminal de la seqüència, augmenta la solubilitat de la proteïna. Tanmateix, el que no canvia en aquesta forma truncada respecte la proteïna completa és la seva tendència a formar agregats solubles en solució que no se separen per gel-filtració. En aquest cas és possible apreciar el dímer en un gel de SDS-PAGE, tot indicant una estabilitat superior d'aquest agregat respecte dels altres que també s'observen.

Conclusions

7 Conclusions

- S'ha determinat que dels tres gens de *Mycoplasma genitalium* descrits com a glicosiltransferases, *mg025*, *mg060* i *mg517*, dos d'ells són essencials per al desenvolupament del microorganisme, *mg060* i *mg517*; mentre que *mg025* és prescindible.
- S'ha determinat que els tres gens de *Mycoplasma genitalium* descrits com a glicosiltransferases es transcriuen tant durant la fase exponencial de creixement del bacteri com durant la fase estacionària, independentment que es tracti de gens essencials o prescindibles.
- S'ha comprovat que l'expressió de GT-MG517, glicosiltransferasa producte de *mg517*, en *E.coli* millora de forma important en ser co-expressada amb un sistema de xaperones. Aquesta millora es tradueix tant en un augment de la quantitat absoluta de proteïna present a la cèl·lula com en l'augment de la quantitat que es pot extreure amb un tampó que conté detergent i glicerol i roman soluble i activa. Per tant, s'ha establert la co-expressió amb xaperones com el protocol estàndard d'expressió de GT-MG517 en *E.coli*.
- S'ha desenvolupat un protocol de purificació de GT-MG517 amb una cua d'His a l'extrem C-terminal expressada en *E.coli*. Aquest protocol inclou l'extracció de la proteïna amb un tampó que conté detergent i glicerol. S'ha comprovat necessària la presència d'ambdós components a partir de la comparativa del poder extractor de diferents tampons, alguns amb el detergent triton x-100 i d'altres amb el detergent CHAPS, i diferents concentracions de glicerol. S'ha establert com a tampó d'extracció més eficient un de composició 20 mM HEPES pH 8, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol, 500 mM NaCl. A partir de l'extracció amb aquest tampó, l'aïllament de GT-MG517 es realitza mitjançant una cromatografia d'afinitat per Ni. El mètode desenvolupat que es considera proporciona una millor puresa a la vegada que una concentració de proteïna elevada, immobilitza GT-MG517 a la columna i n'elimina el detergent amb un tampó de rentat que no conté detergent però sí conserva una concentració elevada de glicerol. Posteriorment, la proteïna s'elueix amb un graó d'imidazole. D'aquesta forma és possible recuperar GT-MG517 amb concentracions al voltant de 5 mg/mL.
- S'ha establert que la purificació de GT-MG517 amb el mètode anterior genera una solució on la proteïna es troba en forma d'agregats solubles no separables mitjançant una cromatografia de gel-filtració.
- S'ha determinat que les principals impureses que acompanyen GT-MG517 són productes de degradació de la pròpia proteïna.
- S'ha dissenyat un assaig d'activitat per GT-MG517, aplicable tant quan aquesta es troba en un extracte proteic amb altres proteïnes com quan s'ha purificat segons el mètode anterior, basat en l'ús d'un substrat radioactiu per l'enzim.

- A partir de l'aplicació de l'esmentat assaig, s'han determinat els paràmetres cinètics de GT-MG517, tant quan l'enzim actua com a monoglicosildiacilglicerol sintasa com quan actua com a diglicosildiacilglicerol sintasa. S'ha establert que la reacció monosintasa és més ràpida que la disintasa, fet que permet afirmar que el producte monoglicosilat surt del centre actiu de l'enzim abans que aquest hi incorpori una segona unitat sacarídica. També s'ha determinat que GT-MG517 pot emprar com a donadors tant UDP-Glc com UDP-Gal, tot i que amb tots els acceptors provats, l'enzim és més ràpid amb aquest últim. Quan actua com a disintasa, l'enzim prefereix que l'acceptor posseeixi una galactosa a l'extrem no reductor, tot i que és capaç de glicosilar un acceptor que contingui una glucosa en aquesta posició. Aquesta és la principal diferència entre GT-MG517 i la glicosiltransferasa equivalent en *Mycoplasma pneumoniae*.
- S'han produït set formes truncades de GT-MG517, en les quals s'han eliminat aminoàcids de l'extrem C-terminal de la proteïna, hipotètica zona d'interacció amb la membrana. Una de les formes truncades correspon al teòric domini d'unió de nucleòtid descrit per a la proteïna i considerat el possible centre d'unió del substrat donador. Cadascuna de les set formes truncades s'ha expressat en *E.coli*, s'ha purificat per cromatografia d'afinitat per Ni i se n'ha determinat el pes molecular per espectrometria de masses. S'han analitzat els glicolípid produïts per cèl·lules d'*E.coli* que expressen cadascuna de les formes truncades i s'ha establert que l'eliminació de més de 10 aminoàcids de l'extrem C-terminal de GT-MG517 inactiva la seva capacitat de produir aquests compostos.
- Per a la forma truncada corresponent al teòric domini d'unió del substrat donador s'ha realitzat una expressió sense xaperones ni detergents, tot obtenint una proteïna soluble però que forma igualment agregats no separables per cromatografia de gel-filtració, especialment un dímer tant estable que es manté en un gel desnaturalitzant. Aquest fet permet afirmar que els agregats que forma la proteïna completa no es produeixen únicament per la zona C-terminal de la proteïna, hipotètica zona d'interacció amb la membrana i inicialment candidata a ser la responsable de l'agregació proteica.

